

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

LES PHÉNOMÈNES DE SANARELLI ET DE SHWARTZMAN OU L'ALLERGIE HÉMORRAGIQUE

par ANDRÉ GRATIA et ROGER LINZ.

Dans une série de publications (1) parues depuis trois ans environ, Shwartzman a étudié le phénomène que voici. Lorsqu'on injecte dans la peau d'un lapin quelques dixièmes de centimètre cube de culture filtrée de certaines souches microbiennes, il ne se produit rien de bien particulier si ce n'est un peu d'infiltration, parfois un peu de congestion et d'œdème; mais si le lendemain on fait une seconde injection, dans les veines, cette fois, d'une petite quantité du même filtrat, ou du filtrat actif d'une autre espèce microbienne, il se produit dans les quelques heures qui suivent une réaction hémorragique dans la peau à l'endroit même où la première injection a été faite.

Comme on peut s'en rendre compte par les photographies ci-jointes (fig. 1, 2, 3, 4), cette réaction hémorragique peut être considérable, et il est étonnant qu'un phénomène aussi frappant n'ait pas attiré davantage la curiosité des chercheurs. Seul, en effet, un récent travail de F. M. Burnet (2) est parvenu à notre connaissance au cours de nos propres recherches sur la question et a apporté, outre la confirmation de la plupart des

observations de Shwartzman, quelques faits personnels très intéressants.

La communication de Shwartzman au 1^{er} Congrès international de microbiologie en juillet 1930 nous incita à entreprendre sur ce phénomène des recherches dont les premiers

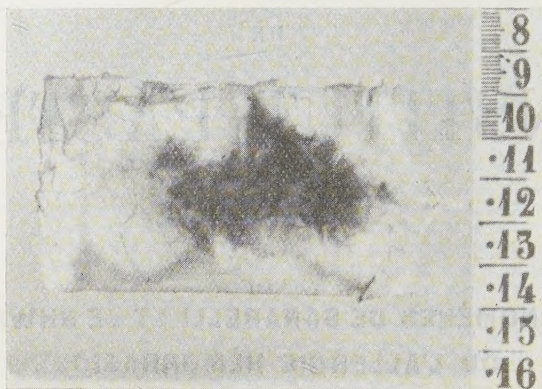


FIG. 1. — Réaction hémorragique quatre heures après l'injection déchainante.
Les pétéchies sont en voie de confluence.

résultats ont été disséminés dans une série de notes préliminaires présentées depuis un an à la Société de Biologie (3) et que nous nous proposons de rassembler dans ce mémoire.

PREMIÈRE PARTIE

Les Conditions du Phénomène.

IDENTITÉ DU PHÉNOMÈNE DE SANARELLI ET DU PHÉNOMÈNE DE SHWARTZMAN.

Nous avons tout d'abord été frappés de la ressemblance de ce phénomène avec les observations antérieurement décrites par Sanarelli (4). Au cours de ses recherches sur la pathogénie du choléra, cet auteur avait constaté que si l'on injecte une culture de choléra dans les veines d'un lapin, cette injection

est, comme on le sait, parfaitement tolérée; mais si le lendemain on fait une seconde injection intraveineuse du filtrat inoffensif d'un microbe banal, comme le *Proteus*, par exemple,

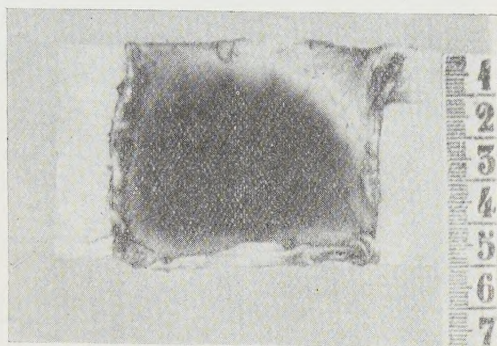


FIG. 2. — Réaction hémorragique vingt-quatre heures après l'injection déchainante. La confluence est complète, l'infiltration sanguine est uniforme.

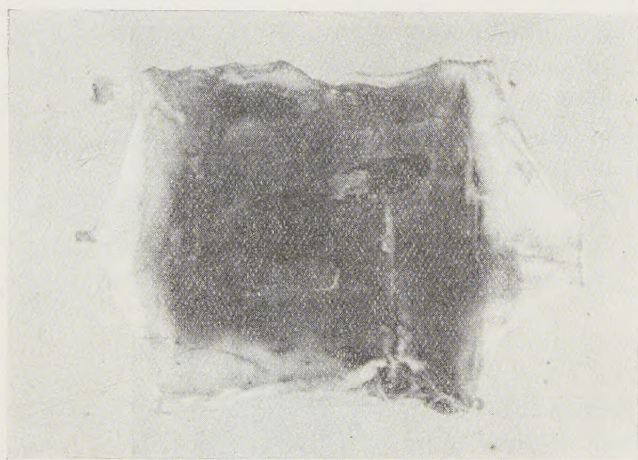


FIG. 3. — Réaction hémorragique particulièrement intense de 7 centimètres \times 8 centimètres.

l'animal est frappé d'algidité et meurt rapidement. On trouve le plus souvent des lésions hémorragiques de l'intestin. Il existe aussi de la congestion du tractus génital qui provoque l'avortement et parfois la cavité péritonéale contient des caillots provenant de quelque hémorragie diffuse.

Nous nous sommes demandé si nous n'obtiendrions pas les mêmes résultats que Sanarelli en utilisant la technique de

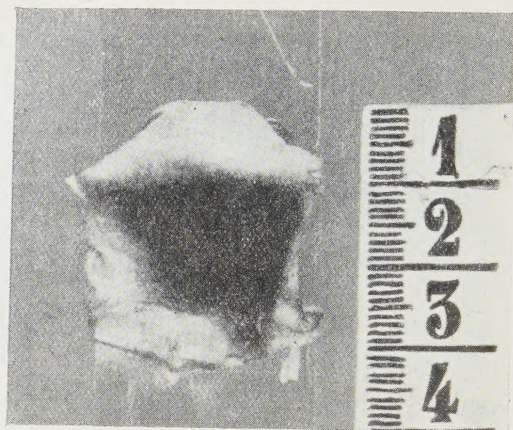


FIG. 4. — Réaction hémorragique au sixième jour. Nécrose.

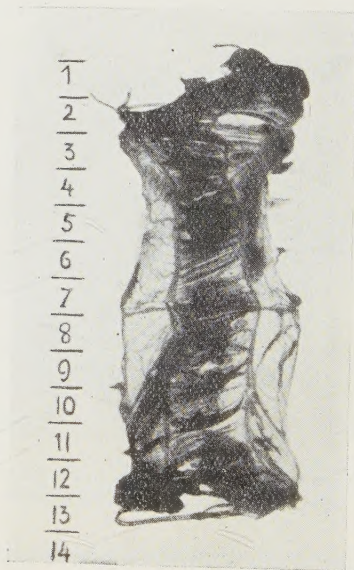


FIG. 5. — Réaction hémorragique du gros intestin.

Shwartzman avec du filtrat de vibron cholérique, que ni Shwartzman, ni Burnet ne semblent avoir employé.

EXPÉRIENCE I. — Nous préparons 6 cobayes de 500 à 600 grammes en leur injectant à chacun, dans la peau de l'abdomen, 0 c. c. 5 d'une culture de choléra en bouillon âgée de six jours et filtrée. Après vingt-quatre heures nous leur injectons 1 cent. cube du même filtrat dans le cœur chez les quatre premiers et dans la veine jugulaire chez les deux derniers.

Résultats : Cobaye A15, *réaction hémorragique de 3 centimètres de diamètre dans la peau au niveau de l'endroit préparé.*

Cobaye A16, *réaction hémorragique de 5 centimètres de diamètre dans la peau au niveau de l'endroit préparé.* Mort le surlendemain en présentant une forte congestion du mésentère, et du liquide séro-sanguant dans la cavité péritonéale.

Cobaye A17. Pas de réaction cutanée. Mort le surlendemain *après avortement*, en présentant une forte congestion intestinale et utérine.

Cobaye A18. Pas de réaction cutanée. Mort le surlendemain avec de la congestion de l'intestin grêle et de *larges taches hémorragiques sur le gros intestin* (fig. 5).

Cobaye A30. Pas de réaction cutanée. Mort deux jours après, la cavité péritonéale *remplie de sang et d'énormes caillots* sans qu'on puisse découvrir le siège de l'hémorragie.

Cobaye A31. Pas de réaction cutanée. Le cobaye survit.

Avec le filtrat de choléra nous obtenons donc soit une réaction de Shwartzman typique à la peau, soit une réaction hémorragique de Sanarelli à l'intestin avec éventuellement de la congestion utérine et avortement ou encore des caillots et du sang dans la cavité péritonéale, provenant d'une hémorragie diffuse dont le siège nous échappe. Nous croyons donc pouvoir déduire de ces résultats que les phénomènes de Shwartzman et de Sanarelli, quoique différant légèrement dans leurs conditions de production, sont essentiellement identiques, conclusion que nous verrons encore se confirmer dans la suite.

LE PHÉNOMÈNE DE SHWARTZMAN.

Le phénomène de Shwartzman est lié à un certain nombre de conditions; il faut : 1° un filtrat actif; 2° un animal sensible; 3° une première injection dans la peau ou *injection préparante*; 4° une seconde injection dans les veines ou *injection déchaî-nante*; 5° un certain intervalle de temps entre ces deux injections. Nous allons passer ces conditions successivement en revue, puis nous essayerons de tirer des faits que cette étude nous apportera des déductions quant à la nature et à la signification du phénomène.

PREMIÈRE CONDITION : le filtrat actif.

Shwartzman a constaté qu'on ne réalise pas son phénomène avec n'importe quel antigène. C'est ainsi que le sérum de cheval, le blanc d'œuf ne donnent que des résultats négatifs. Sont actifs seulement les produits de culture de certaines souches microbiennes telles que les microbes du groupe colityphique, paratyphique-dysentérique, le méningocoque, le pneumocoque, certaines souches de streptocoques et notamment ceux isolés de cas de scarlatine, les bacilles de la coqueluche (Shwartzman et Frisch) et de l'influenza (Gross). Par contre, le staphylocoque est inactif. Comme nous l'avons montré dans l'expérience I, il faut ajouter le vibron cholérique à la liste des microbes actifs.

Shwartzman prépare ses filtrats de deux façons : il filtre sur bougie ou bien des cultures en bouillon laissées six jours à 37°, ou bien des émulsions en eau physiologique de cultures de vingt-quatre heures sur gélose. Comme il lui semble avoir de meilleurs résultats avec ce dernier mode de préparation et que, d'autre part, il lui paraît exister une certaine relation au sein même d'une espèce microbienne entre la toxicité de la souche employée et l'intensité de la réaction obtenue, il en conclut que les principes actifs du filtrat doivent être des *exotoxines*. Burnet ne partage pas cette façon de voir. Pour lui, au contraire, ce sont les vieilles cultures en bouillon qui donnent les meilleurs résultats et, en ce qui concerne le *B. coli* tout au moins, nous sommes d'accord avec lui. Aussi pense-t-il que les principes actifs sont des *endotoxines*. Ce qui le confirme dans cette opinion c'est que le staphylocoque qui fournit une puissante exotoxine est tout à fait inactif; par contre il obtient des résultats excellents à l'aide de l'endotoxine typhique préparée selon le procédé de Besredka en broyant des bacilles typhiques avec du NaCl et en extrayant ensuite à l'eau distillée. Nous avons répété cet essai avec le *B. coli* et vérifié l'excellence de l'endotoxine ainsi préparée; mais n'ayant trouvé aucun avantage important à cette préparation laborieuse, nous avons continué à nous servir de filtrats de cultures en bouillon âgées de six jours.

Shwartzman a montré que les principes actifs sont thermostables et résistent à 100°. Il a fait des essais de purification,

mais qui nous apprennent peu de chose sur leur nature. Il nous a paru intéressant de rechercher si les principes actifs étaient dialysables.

EXPÉRIENCE II. — Nous utilisons le procédé de dialyse très simple que l'un d'entre nous a décrit il y a plusieurs années (3). Une boîte de Pétri est divisée en deux étages par un septum de « cellophane » du modèle le plus mince, déprimé de façon à y ménager une concavité. On stérilise cet appareil à l'autoclave, puis on verse du bouillon stérile dans les deux compartiments séparés par la membrane dialysante. On ensemence le bouillon du compartiment supérieur avec une culture de *B. coli* V. et on place le dispositif à 37°. Après trois jours, la culture a abondamment poussé dans l'étage supérieur, tandis que le bouillon de l'étage inférieur est resté stérile. On récolte séparément les deux bouillons et filtre le premier sur bougie Chamberland L3 après l'avoir centrifugé. On prépare deux lapins de 1 kilogramme avec 0 c. c. 5 de ce filtrat dans la peau de la fesse et quatre autres lapins du même poids avec 0 c. c. 5 du dialysat. Après vingt-quatre heures, on injecte 1 cent. cube de filtrat dans les veines des deux premiers lapins et 1 cent. cube de dialysat dans les veines des quatre derniers.

Les deux premiers lapins donnent une réaction hémorragique positive tandis que les quatre derniers ne présentent qu'un léger érythème. On réinjecte ces derniers avec cette fois 1 cent. cube de filtrat actif dilué au 1/5, pour voir s'ils n'étaient pas préparés et ne réagiraient pas, mais il n'en est rien.

Avec le dialysat de cultures de *B. coli* V on ne peut donc ni préparer ni déchaîner la réaction de Shwartzman. Les principes actifs ne semblent donc pas être dialysables.

EXPÉRIENCE III. — On refait l'expérience précédente en opérant la dialyse en sac de collodion à l'aide du dispositif très simple que voici. Un sac de collodion est ajusté et scellé à l'aide de collodion à une extrémité ouverte d'un tube de verre dont l'autre extrémité est bouchée à l'aide d'un tampon de coton. On remplit le sac de bouillon et le plonge dans un tube plus large contenant également du bouillon. On fixe le premier tube dans le second à l'aide d'un manchon de coton. Le tout est stérilisé à l'autoclave. On ensemence ensuite le bouillon contenu à l'intérieur du sac. Après quatre-vingt jours à 37°, le bouillon extérieur est toujours limpide, tandis qu'une abondante culture s'est développée à l'intérieur du sac. Avec ces deux liquides, on refait l'expérience II et l'on obtient le même résultat, c'est-à-dire réaction positive avec le filtrat de la culture intérieure, négative avec le dialysat extérieur.

On peut donc conclure de ces expériences que les principes actifs ne sont pas dialysables.

Qu'arriverait-il si on dissolvait des cultures, soit par le bactériophage, soit par un streptothrix? Les microbes dont les cultures normales sont inactives ne libèreraient-ils pas des prin-

cipes actifs en se dissolvant, ou bien, au contraire, des cultures actives ne perdraient-elles pas leur activité par la dissolution?

EXPÉRIENCE IV. — On ensemence deux séries de tubes de bouillon avec du staphylocoque. Quatre heures après, les tubes sont troubles. On ajoute V gouttes de bactériophage antistaphylococcique à chacun des tubes de la première série. La croissance continue à se développer un certain temps; mais le lendemain, tous les tubes de la première série sont clairs. On filtre alors les cultures dissoutes d'une part, les cultures normales, après centrifugation, d'autre part. On essaie l'activité des deux filtrats sur des lapins de 1 kilogramme à raison de 0 c.c. 5 dans la peau, puis 1 cent. cube le lendemain, dans les veines. Les résultats sont également négatifs chez les lapins injectés de cultures dissoutes et chez ceux injectés de cultures non dissoutes.

Le bactériophage ne libère donc pas de principe actif en dissolvant le staphylocoque dont les cultures normales sont inactives.

EXPÉRIENCE V. — Même expérience que la précédente en remplaçant le staphylocoque par du *B. coli* et le bactériophage antistaphylococcique par du bactériophage anti-*coli*. Cette fois, les résultats sont positifs pour les cultures dissoutes comme pour les cultures normales.

Le bactériophage ne détruit pas le principe actif du *B. coli* dont les cultures normales sont actives.

EXPÉRIENCE VI. — On ensemence des tubes de gélose avec différents microbes les uns actifs, comme le *B. coli* ou le vibron cholérique, les autres inactifs, comme le staphylocoque ou le bacille diphtérique. Après vingt-quatre heures, on émulsionne les cultures dans de l'eau distillée stérile, puis on lave les émulsions trois fois. On filtre la dernière eau de lavage et vérifie qu'elle est inactive. On ensemence ensuite les émulsions avec du streptothrix, puis trois jours plus tard, lorsqu'elles sont dissoutes, on les filtre. On les essaie sur des lapins de 1 kilogramme et des cobayes de 500 grammes à raison de 0 c. c. 5 dans la peau et, le lendemain, de 2 cent. cubes dans les veines. Les mycolysats de staphylocoque, de *B. diphtérique* et de *V. cholérique* sont négatifs, tandis que les mycolysats de *B. coli* sont positifs.

La mycolyse de bacilles inactifs (staphylo-diphtérie) ne libère pas de principes actifs, tandis que la mycolyse d'un bacille actif comme le *B. coli* ne détruit pas son activité. Il semble, toutefois, que le choléra fasse exception.

N'obtiendrait-on pas de réaction avec des toxines végétales telles que la ricine?

EXPÉRIENCE VII. — On prépare une solution de ricine au 1/10.000. On en injecte 0 c. c. 5 dans la peau de deux lapins. Après vingt-quatre heures, la région préparée est infiltrée et congestionnée. On injecte 1 cent. cube de la même solution, dans les veines, le lendemain. Il n'y a pas de réaction. On injecte aussitôt 1 cent. cube de filtrat de *B. coli* V. On voit apparaître une réaction légèrement positive.

Il semble donc que la ricine soit active, mais en injection préparante seulement. Peut-être ce résultat semble-t-il indiquer que les facteurs préparants et déchaînants pourraient ne pas être identiques. Mais il y aurait lieu de refaire des essais plus nombreux et variés, avant de tirer une conclusion quelconque à ce sujet.

Shwartzman a vainement mis à l'épreuve différentes substances, mais il ne semble pas qu'il ait essayé le lait qui est si largement employé comme agent de protéinothérapie non spécifique. Nous avons donc tenté l'expérience suivante.

EXPÉRIENCE VIII. — On injecte dans la peau de la fesse de quatre lapins de 1 kilogramme 0 c. c. 5 de lait cru provenant d'une vache saine qu'on venait de traire. Après vingt-quatre heures, on injecte 1 cent. cube de ce lait conservé à la glacière, dans les veines de deux de ces lapins, tandis que l'on injecte 1 cent. cube de filtrat de *B. coli* V dans les veines des deux autres. Aucun des quatre lapins ne fait de réaction cutanée. Les deux premiers lapins qui ont reçu du lait en injection préparante et en injection déchaînante paraissent malades. L'un d'eux meurt le lendemain; à l'autopsie, la muqueuse du gros intestin est uniformément infiltrée de sang.

A la suite de ce résultat, nous avons recommencé l'expérience, mais vainement. La forte réaction hémorragique intestinale que nous avons donc observée sur un lapin seulement n'est peut-être qu'une coïncidence purement accidentelle et n'est pas suffisante pour en tirer une conclusion quelconque quant à l'activité du lait. Signalons en passant que les lapins ainsi injectés de lait et qui ne meurent pas tout de suite se cachectisent et perdent leurs poils.

Shwartzman a essayé sans résultat de voir si le blocage local du système réticulo-endothélial par l'encre de Chine pouvait préparer la peau à la réaction. Nous avons pu observer de notre côté qu'en injectant de l'encre de Chine à fortes doses dans la cavité péritonéale jusqu'à ce que toute la peau devienne tout à fait noire, nous n'avons pas modifié la sensibilité des lapins qui n'ont réagi ni plus ni moins fort au phénomène.

Shwartzman a aussi essayé sans succès de préparer des lapins en leur injectant dans la peau des substances pouvant provoquer de la congestion ou des traumatismes, telles que des arséniate. Nous avons aussi essayé, avec le même insuccès, la préparation à l'aide, soit d'eau distillée, soit de solution très hypertonique (NaCl 20 p. 100). Il résulte donc de tous ces faits que l'on ne réussit à préparer les lapins qu'à l'aide des produits de certains microbes et peut-être aussi à l'aide de toxines végétales comme la ricine.

DEUXIÈME CONDITION : l'animal sensible.

Toutes les expériences de Shwartzman et de Burnet ont été faites sur le lapin. Ces auteurs ont tous deux observé des différences individuelles très nettes dans l'aptitude de ces animaux à fournir une réaction hémorragique positive. Il faut donc distinguer des individus sensibles et des individus réfractaires. On peut, semble-t-il, accepter les proportions suivantes : 60-70 p. 100 de lapins sont sensibles et donnent une réaction positive, 10 à 20 p. 100 sont hypersensibles et meurent avant d'avoir eu le temps de donner la réaction locale et 20 à 30 p. 100 environ sont réfractaires. Burnet n'a pas observé de différences notables dans la sensibilité des lapins sauvages par rapport aux lapins domestiques. Nous avons constaté personnellement que ces différences individuelles existaient même parmi des lapins d'une même nichée. On pouvait se demander si le sexe n'avait pas d'influence, mais nous n'avons pas pu remarquer de distinction bien nette entre les mâles et les femelles quant à leur sensibilité. A cet égard, nous nous proposons de vérifier si l'état de gestation ne pourrait pas modifier la réaction. Par contre, l'âge de l'animal n'est pas indifférent. Nous avons toujours obtenu de plus fortes réactions chez des lapins jeunes, de un à deux mois par exemple, que chez des lapins vieux. Chose très importante, les nouveau-nés ne paraissent pas aptes à réagir ainsi qu'il ressort de l'expérience suivante :

EXPÉRIENCE IX. — Une lapine met bas sept jeunes. Le jour même, on prépare la peau de la fesse de l'un d'eux avec 0 c. c. 2 de filtrat actif de *B. coli* V. Après vingt-quatre heures, on lui injecte dans la cavité péritonéale 0 c. c. 5 de filtrat. Il ne se produit pas de réaction. Le lapereau succombe le lendemain et ne présente aucune manifestation hémorragique. Un autre

nouveau-né est traité de même à son deuxième jour avec le même résultat négatif. On recommence sur deux autres lapereaux au septième jour, puis sur deux autres au quinzième jour, toujours avec le même résultat négatif. On essaie, enfin, sur le dernier au vingt et unième jour. Cette fois l'injection a pu être faite dans la veine de l'oreille et la réaction est fortement positive.

Le résultat négatif chez les nouveau-nés tient-il à ce que l'on a dû faire chez ceux-ci l'injection déchaînante dans le péritoine ou bien à ce qu'ils ne sont réellement pas aptes à réagir avant la troisième semaine ? C'est ce que nous essayerons de préciser au cours de nouveaux essais.

Nous avons étendu l'étude du phénomène à d'autres espèces animales que les lapins. Comme on a déjà pu le voir par l'expérience I, les cobayes sont également sensibles, toutefois, la réaction hémorragique a un caractère moins prononcé. Fait curieux, sur lequel nous insisterons plus loin, nous avons constaté que les rats et les souris sont totalement réfractaires. Ces différences de sensibilité entre espèces et entre individus ont non seulement des conséquences théoriques importantes, mais encore la conséquence pratique d'exiger l'emploi d'un grand nombre de lapins ou de cobayes pour arriver à une conclusion certaine. Aussi n'est-il pas impossible que certaines des notions que nous signalons dans ce mémoire devront être revisées ultérieurement, à mesure que les expériences auront été multipliées sur un plus grand nombre d'animaux.

TROISIÈME CONDITION : l'injection préparante.

Dans les recherches de Shwartzman et de Burnet, le siège de l'injection préparante est habituellement la peau, et particulièrement la peau du ventre ou du dos. Bien entendu, d'autres endroits de la peau conviennent tout aussi bien et nous avons très souvent utilisé la peau de la face externe du haut de la cuisse, qu'improprement nous appelons la fesse, pour la facilité. Dans un certain nombre d'expériences, nous avons choisi de préférence les oreilles qui offrent de nombreux avantages : elles sont symétriques, l'une pouvant servir de témoin à l'autre ; elles sont aisément accessibles ; très vascularisées et transparentes, elles permettent d'observer et de suivre le processus hémorragique et les altérations vasculaires qu'à l'aide

d'un petit artifice on peut même étudier au microscope. Elles peuvent encore être aisément énervées et isolées; bref, elles se prêtent à de multiples combinaisons expérimentales sur lesquelles nous reviendrons ultérieurement.

Chose curieuse, sur laquelle nous croyons devoir attirer l'attention, il nous est arrivé fréquemment d'observer non seulement une réaction hémorragique au niveau de la peau de l'oreille préparée, mais encore des lésions purpuriques au niveau des vaisseaux de l'oreille non préparée.

Afin d'obtenir une zone de préparation assez large, nous avons uniformément administré 0 c. c. 3 à 0 c. c. 5 de filtrat actif en injection intradermique.

En réalité, la peau n'est pas le seul organe dans lequel la réaction de Shwartzman puisse se manifester. Déjà Shwartzman signale brièvement qu'il a obtenu la réaction hémorragique dans le rein et dans le poumon à la suite de la préparation de ces organes.

Toutefois, on retire de la lecture des travaux de Shwartzman l'impression qu'il ne serait pas possible d'obtenir une réaction généralisée. Cette façon de voir nous paraissait en désaccord avec les conditions et les effets du phénomène de Sanarelli dont l'identité avec le phénomène de Shwartzman n'est pas douteuse. Il était donc à prévoir que l'on devrait pouvoir obtenir une généralisation des lésions hémorragiques si l'injection préparante était faite dans les veines au lieu d'être faite dans la peau. C'est d'ailleurs ce que nous avons observé au cours d'expériences faites dans un tout autre but.

EXPÉRIENCE X. — Nous préparons trois lapins avec 0 c.c. 3 de filtrat de *B. coli* V dans la peau de la fesse. Le lendemain, dans le but de rechercher si l'on n'arriverait pas à désensibiliser par des injections subintrales ces lapins préparés, nous procédons à l'injection intraveineuse de doses d'abord infinitésimales, puis progressivement croissantes de filtrat actif. Nous injectons dans les veines, à deux heures d'intervalle, 1 cent. cube des dilutions suivantes : 1/10.000, 1/5.000, 1/2.500, 1/1.000, 1/500, 1/100, 1/10, puis pur. Nous n'avons pas obtenu de désensibilisation. Au contraire, nous avions à peine dépassé l'injection au 1/500 que déjà les lapins commençaient à réagir à l'endroit préparé de la peau. On continue cependant la série complète des injections, la quantité totale de filtrat injecté dans les veines n'atteignant même pas 1,2 c. c. Le lendemain, les trois lapins sont morts. A l'autopsie, on trouve chez l'un d'eux des hémorragies dans le gros intestin, les reins et les poumons, chez les deux autres la cavité péritonéale est remplie de sang et l'on trouve des caillots sur l'épiploon.

Nous avons conclu de ces observations qu'en vérité notre série d'injections intraveineuses avait successivement préparé l'organisme aux effets déchainants des dernières injections. S'il en était ainsi, on devrait donc pouvoir obtenir le même résultat en remplaçant la préparation cutanée par une préparation intraveineuse.

EXPÉRIENCE XI. — Nous injectons 0 c.c. 5 de filtrat de *B. coli* V dans les veines de quatre lapins de 1 kilogramme. Le lendemain, nous injectons dans



FIG. 6. — Réaction hémorragique du rein. Expérience XI.

les veines de deux de ces lapins une seule injection de 1 cent. cube du même filtrat, tandis qu'aux deux autres nous injectons toutes les quatre heures 1 cent. cube d'une des dilutions suivantes : 1/1.000, 1/100, 1/10, puis pur.

Le lendemain, un des deux premiers lapins succombe ainsi qu'un des deux seconds. L'autopsie des deux animaux est identique. Il y a du sang dans la cavité péritonéale, des taches hémorragiques sur l'intestin; les reins sont farcis de pétéchies (fig. 6), tandis que les poumons sont constellés de taches hémorragiques circulaires de toutes tailles dont certaines sont confluentes et

donnent à l'ensemble de l'organe un aspect rappelant celui d'une cravate à pois (fig. 7). Divers ganglions, notamment les ganglions axillaires et leur voisinage, sont fortement hémorragiques ainsi que le thymus et la moelle osseuse.

Cette expérience ne laisse aucun doute sur la possibilité de préparer les animaux par la voie veineuse et sur le caractère général des réactions.

On nous objectera que ces **résultats** pourraient être dus aux

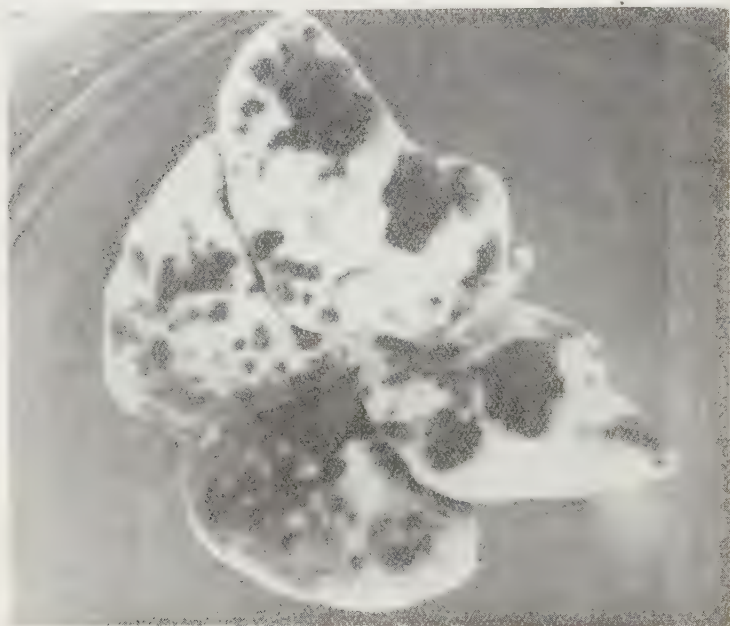


FIG. 7. — Réaction hémorragique du poumon. Expérience XI.

simples effets toxiques primaires des doses relativement élevées de filtrat de *B. coli* injectées dans les veines. En vérité, nous pouvons affirmer qu'il n'en est rien, car nous avons obtenu le même effet avec des doses moindres, à condition que le total relativement minime injecté soit réparti en une injection préparante, d'une part, et une ou plusieurs injections déchainantes, d'autre part. Par contre, si l'on ne fait qu'une seule injection intraveineuse chez un animal neuf, on peut alors injecter des doses relativement énormes jusqu'à 5 cent. cubes de filtrat pur, sans provoquer d'autres troubles que de la diarrhée, et si, par

la suite, un de ces animaux succombe, on n'y trouve nulle part trace de réaction hémorragique. Les hémorragies sont donc bien dues aux effets de la double injection.

Il nous a paru intéressant de voir si des tumeurs pouvaient être le siège de ces réactions hémorragiques. Il fallait pour cela une tumeur qui ne fût pas déjà hémorragique par elle-même et qui se développât chez un animal d'une espèce sensible au phénomène de Shwartzman. Nous avons pensé que le sarcome du cobaye répondait à ces desiderata.

EXPÉRIENCE XII. — Nous devons à l'obligeance de M^{lle} Mendeleeff une souche de liposarcome qui, normalement, a un aspect avasculaire, c'est-à-

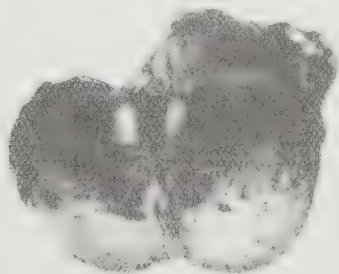


FIG. 8. — Réaction hémorragique dans le liposarcome du cobaye.
Expérience XII.

dire qu'il paraît blanc comme du lard. Nous avons greffé un certain nombre de jeunes cobayes avec des fragments de ce sarcome. Lorsque, après quelques semaines, les greffes atteignent des dimensions variant entre celles d'un œuf de pigeon et celles d'un œuf de poule, nous en préparons plusieurs avec une injection intratumorale de 0 c. c. 3 de filtrat de *B. coli*. Après vingt-quatre heures, nous faisons chez ces cobayes préparés une injection déchainante de 1 cent. cube du même filtrat dans la veine jugulaire ou dans la cavité péritonéale. Quelques-uns de ces cobayes succombent dans les quelques jours qui suivent. A l'autopsie, on trouve une réaction hémorragique très intense s'étendant à une large portion de la tumeur qui, à ce niveau, présente l'aspect d'un caillot contrastant avec la blancheur de la portion restée normale (fig. 8). D'autres ne succombent qu'après plusieurs semaines. Chez ceux-ci, on trouve à l'endroit où devait avoir eu lieu la réac-

tion hémorragique, un foyer de nécrose avec même une véritable liquéfaction des tissus, mais autour de ce foyer nécrotique la tumeur avait continué à proliférer vers la périphérie. Entre la partie nécrosée et la partie normale existe une zone de réaction hémorragique dans laquelle l'examen microscopique révèle une remarquable prolifération vasculaire.

Nous avons conclu de ces observations qu'on peut obtenir une réaction de Shwartzman dans un sarcome de cobaye à l'aide de filtrat microbien.

QUATRIÈME CONDITION : l'injection déchaînante.

Pour être efficace, la seconde dose de filtrat doit être introduite rapidement dans la circulation sanguine. L'injection déchaînante devra donc être faite dans les veines ou, à la rigueur, dans la cavité péritonéale ainsi que l'a montré Frisch (6), collaborateur de Shwartzman. Chez le cobaye, nous avons pratiqué l'injection déchaînante, selon les circonstances, soit dans la veine jugulaire, soit dans le cœur, soit dans la cavité péritonéale avec un égal succès.

Shwartzman a constaté que les injections sous-cutanées et intramusculaires sont sans effet. Chose fort curieuse observée par Burnet, la seconde injection ne donne rien non plus si elle est portée directement dans la région même de la peau qui avait été préparée par la première injection. Chose plus curieuse encore, Burnet a observé que non seulement l'injection de filtrat dans la région préparée ne donne pas lieu à la réaction, mais elle désensibilise même cet endroit aux effets hémorragiques de l'injection déchaînante faite ensuite dans les veines. C'est là une expérience des plus importantes sur laquelle nous aurons à revenir plus loin.

La dose recommandée par Shwartzman pour l'injection déchaînante est de 0 c. c. 2 par kilogramme. Comme on l'a vu dans nos expériences, nous employons souvent une dose uniforme de 1 cent. cube sans tenir beaucoup compte du poids de l'animal. En vérité, nous avons constaté que l'on peut avoir des résultats positifs avec des doses bien inférieures, avec 0 c. c. 1, 0 c. c. 01 et voire même 0 c. c. 001 de filtrat.

Ce qui caractérise donc l'injection déchaînante c'est que le filtrat doit pénétrer rapidement dans la circulation générale, et c'est aussi l'efficacité d'une dose relativement minime chez

un animal préparé, en comparaison de la dose relativement énorme que l'on peut injecter impunément chez un animal neuf.

CINQUIÈME CONDITION : l'intervalle entre les deux injections.

Shwartzman a constaté que l'on obtenait des résultats constamment positifs si l'on attendait en moyenne une vingtaine d'heures après l'injection préparante pour faire l'injection déchainante. Au contraire, il n'obtient que des résultats négatifs si la seconde injection est faite soit dans les six heures qui

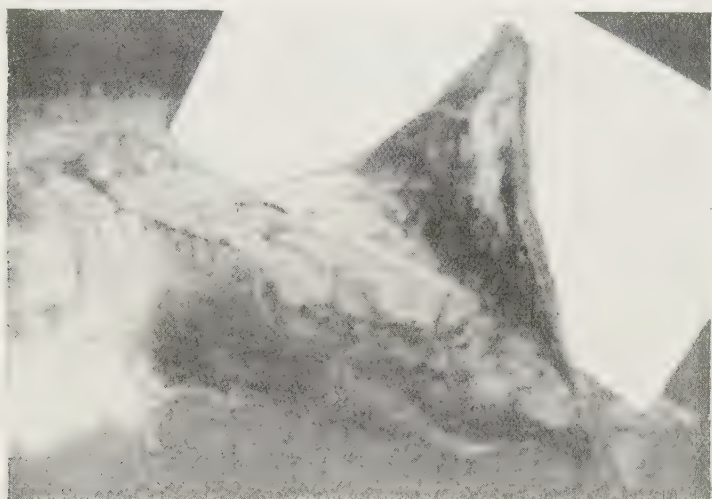


Fig. 9. — Extension de la réaction hémorragique au tissu sous-cutané.

suivent la première injection ou encore si l'intervalle de temps dépasse quarante-huit heures.

En vérité, il y aurait lieu de préciser davantage les limites, minimale et maximale, du délai effectif. Nous y reviendrons plus loin et verrons qu'en fait le délai minimum peut être sensiblement inférieur à une vingtaine d'heures.

Lorsque toutes les conditions que nous venons de passer en revue ont été remplies on voit apparaître la réaction hémorragique.

LA RÉACTION HÉMORRAGIQUE. — Celle-ci commence à se manifester déjà trois ou quatre heures après l'injection déchainante,

parfois même plus rapidement encore. Elle débute par de la congestion de la région préparée, puis par des éclatements vasculaires sous forme de pétéchies d'abord disséminées et petites mais qui, rapidement se multiplient, s'étendent (fig. 4), confluent, tandis que le sang qui s'en échappe s'infiltre bientôt de façon uniforme en formant une large et épaisse nappe hémorragique (fig. 2 et 3 pouvant s'étendre dans le tissu sous-cutané (fig. 9), et même dans le muscle sous-jacent.

Par suite de ces troubles vasculaires, cette région dorénavant mal nourrie est vouée à la nécrose. Elle devient tout à fait noire. Il s'y forme une croûte desséchée sous laquelle les tissus se réparent et se cicatrisent (fig. 4).

Cette lésion, dont l'étude histologique fera l'objet d'un autre mémoire, rappelle singulièrement celle que provoque l'injection locale de sérum antiplaquette dont Roskam (7) a récemment étudié plus particulièrement les effets angiotoxiques. Etant donné ce rapprochement, nous nous sommes demandé si l'injection ménagée de sérum antiplaquette dans les veines d'un lapin ne le désensibiliserait pas contre les effets du phénomène de Shwartzman, ou bien si, au contraire, il ne le rendrait pas plus sensible en augmentant sa fragilité vasculaire. C'est cette seconde éventualité qui, comme il fallait plutôt s'y attendre, s'est vérifiée au cours de l'expérience que voici.

EXPÉRIENCE XIII. — On prépare trois lapins de 2 kilogrammes environ avec 0 c. c. 5 de filtrat *B. coli* V dans la peau, à 10 heures. A 17 heures, on leur injecte dans les veines 1 cent. cube de sérum antiplaquette. Cette injection est poussée de façon extrêmement lente (20 minutes) pour éviter un accident mortel. Malgré cela, un des lapins succombe au cours de l'injection. Les deux autres survivent. Le lendemain à 12 heures, on leur fait une injection intraveineuse de 1 cent. cube de filtrat. Déjà une heure après, la réaction commence et se déroule à vue d'œil avec une rapidité et une intensité toute particulière.

Loin donc de désensibiliser l'organisme à la réaction de Shwartzman une injection ménagée de sérum antiplaquette favorise le processus. Ce rapprochement attire notre attention sur la part que doivent prendre probablement les plaquettes dans la réaction.

DEUXIÈME PARTIE

Relations avec l'anaphylaxie et l'immunité.

Dans la première partie de ce mémoire nous avons rappelé les conditions du phénomène de Shwartzman en essayant d'en préciser certaines données. Nous allons à présent tenter de tirer de ces faits des conclusions quant à la nature et à la signification du phénomène en recherchant une interprétation qui, tout en étant le plus conforme possible à la réalité, nous oriente surtout vers de nouvelles recherches.

Il est un phénomène auquel on songe tout naturellement quand on voit ainsi une réaction hémorragique et nécrotique succéder à deux injections, l'une préparante et l'autre déchaînante, séparées par un certain intervalle; ce phénomène, c'est l'anaphylaxie.

Qu'il me soit permis de rappeler ici que l'anaphylaxie n'est pas, comme le pensait Richet au début, lorsqu'il lui a donné ce nom, l'inverse de l'immunité, mais bien au contraire un accident de l'immunité. En réalité, les animaux anaphylactisés sont immunisés et ce n'est pas à une exagération de la sensibilité à la toxicité primaire de l'antigène qu'ils succombent, mais bien à une action nouvelle, à une allergie, le choc anaphylactique toujours identique à lui-même quel que soit l'antigène injecté. C'est la brutalité de la combinaison entre l'antigène de l'injection déchaînante et les anticorps existant chez l'animal préparé qui provoque dans l'organisme une véritable révolution. D'après la théorie classique, la réaction antigène-anticorps donne lieu à un poison : l'anaphylatoxine. Pour Bordet, cette anaphylatoxine résulte du déséquilibre des constituants du plasma sanguin dont certains sont soustraits par les propriétés absorbantes du complexe antigène-anticorps. C'est ainsi que du sérum normal traité par une substance adsorbante comme la gélose, puis centrifugé, devient énergiquement anaphylactique. Pour Lumière, c'est le précipité très ténu, visible ou invisible, résultant de la réaction antigène-anticorps qui irrite l'endothélium vasculaire, excite les extrémités des fibres vaso-dilatatrices et déclenche ainsi les manifestations du choc. Parmi celles-ci, je rappelle que l'on trouve des pétéchies hémorragiques dans le poumon, les reins et l'intestin, de la stase capillaire, de la chute de la pression sanguine, une diminution du nombre des leucocytes et des plaquettes, de l'incoagulabilité du sang corrigible par le passage d'un courant de CO².

Sanarelli n'a pas hésité à considérer les réactions qu'il obtenait comme des manifestations anaphylactoïdes, sans toutefois

apporter de preuves expérimentales à l'appui de son opinion. Shwartzman aussi a songé à l'anaphylaxie, mais pour rejeter bientôt toute relation de celle-ci avec son phénomène. Il se base pour cela sur une série d'arguments fort raisonnables que voici. Tout d'abord on ne produit pas sa réaction avec n'importe quel antigène, et notamment pas avec l'antigène classique de l'anaphylaxie, le sérum de cheval. Ensuite, la réaction n'est pas spécifique et, s'il doit exister un certain délai entre l'injection préparante et l'injection déchaînante de filtrat microbien, ce délai n'est pas celui de l'anaphylaxie, il est beaucoup plus rapide et aussi plus fugace. Enfin selon Shwartzman, contrairement à l'anaphylaxie, son phénomène ne se prêterait pas à la transmission passive.

Si importantes que soient ces raisons, elles ne nous paraissent pas décisives. Depuis la découverte de Richet, le champ de l'anaphylaxie s'est étendu et modifié à mesure qu'on l'étudiait, absolument comme un continent ne conserve pas partout l'aspect de la côte par où on l'a abordé, et peut varier sensiblement à mesure qu'on le pénètre davantage. D'aucuns sans doute considèrent cette extension comme un abus ; il n'en est pas moins vrai que l'on peut à présent obtenir des chocs anaphylactiques typiques par des moyens qui ne respectent pas les conditions de l'anaphylaxie classique. Le sérum gélosé de Bordet notamment reproduit toutes les manifestations du choc et l'histamine en provoque les principales, hormis l'incoagulabilité du sang. On peut donc réaliser le choc sans véritable antigène et sans délai. Quant à l'absence de spécificité, rappelons que déjà Richet distinguait à côté de l'anaphylaxie spécifique une anaphylaxie générale, non spécifique, dont il prévoyait l'importance. Arthus est plus formel encore, puisque pour lui l'anaphylaxie chez le lapin n'est pas du tout spécifique. Quant à l'expérience que Shwartzman invoque pour nier l'existence d'une transmission passive du phénomène, elle est inspirée par l'idée préconçue que si la réaction est anaphylactique, c'est qu'il doit s'être formé très rapidement des anticorps dans la région préparée. Par conséquent, on devrait s'attendre d'après Shwartzman à obtenir une réaction hémorragique si l'on injecte du filtrat typhique dans les veines immédiatement après avoir injecté du sérum antityphique dans la peau. Or,

cette éventualité ne se vérifiant pas, Shwartzman en conclut qu'il n'y a pas de transmission passive du phénomène. En vérité, il se pourrait fort bien que des substances actives viennent se concentrer dans la région préparée, mais que ces substances actives ne soient nullement des anticorps spécifiques.

Dans le but de rechercher l'éventuelle concentration de ces hypothétiques substances dans la peau préparée, nous avons recouru au stratagème suivant :

EXPÉRIENCE XIV. — Après avoir épilé la peau du flanc d'un lapin et l'avoir désinfectée à la teinture d'iode et à l'alcool, nous faisons une petite incision de 1 cent. de large par laquelle nous introduisons la pointe d'un bistouri avec lequel nous décollons la peau sur la longueur de la lame. Nous introduisons dans ce clapier sous-cutané et y poussons tout au fond un fragment d'éponge de Venise stérile, imbibé de 0 c. c. 5 de filtrat de *B. coli* V. Nous fermons l'orifice du clapier à l'aide d'une agrafe. Après vingt-quatre heures, la région ainsi préparée est congestionnée, infiltrée et oedématiée. Nous retirons le fragment d'éponge que nous déposons dans un verre à pied stérile, y ajoutons 0 c. c. 5 d'eau physiologique; puis, après dix minutes de macération, nous exprimons avec une pince stérile le liquide emprisonné dans l'éponge. Le jus ainsi obtenu est injecté à 3 lapins neufs dans la peau de l'oreille à raison de 0 c. c. 5 par lapin. Quatre à cinq heures après, nous injectons dans la veine 1 cent. cube de filtrat de *B. coli* V. Le lendemain, 2 des lapins présentent à l'oreille préparée une réaction de Shwartzman typique (fig. 10 et 11).

Cette expérience nous avait paru démontrer de façon formelle la transmission passive du phénomène, puisque l'animal préparé passivement par le jus d'éponge était déjà apte à réagir cinq heures après cette préparation, alors que, selon Shwartzman, le temps moyen de préparation active est d'une vingtaine d'heures. En vérité, dans le but de contrôler notre expérience, nous avons entrepris de préciser davantage le temps minimum de préparation active, et nous avons vu alors que ce temps pouvait être fortement réduit comme le prouve l'expérience suivante.

EXPÉRIENCE XV. — Nous préparons 6 lapins en leur injectant 0 c. c. 3 de filtrat de *B. coli* V dans la peau d'une oreille. Nous faisons ensuite une injection déchainante de 1 cent. cube dans les veines, quatre heures après chez 2 lapins, six heures après chez 2 autres, et huit heures après chez les deux restants. Ces deux derniers font une réaction très nette, les deux précédents réagissent également l'un plus nettement que l'autre, les deux premiers ne réagissent pas du tout.

On peut donc fixer à six heures le temps minimum nécessaire à la préparation active. Il est intéressant de rechercher si une première préparation ne diminuerait pas le délai minimum d'une seconde préparation. A cet effet, nous faisons l'expérience suivante.

EXPÉRIENCE XVI. — Nous préparons 2 lapins par une injection de 0 c. c. 3 dans la peau d'une oreille. Quatre heures plus tard, nous faisons une seconde



FIG. 10. — Réaction hémorragique « passive (?) » Expérience XIV.
Vue par réflexion.

injection préparante identique, dans la peau de l'autre oreille, ainsi que dans la peau de l'oreille de 2 lapins neufs. Quatre heures après, nous injectons 1 cent. cube de filtrat de *B. coli* V dans les veines des 4 lapins. Les 2 premiers lapins font une réaction positive aux deux oreilles, celle qui n'a que quatre heures de préparation, comme celle qui en a huit, tandis que les deux autres lapins ne réagissent pas.

On peut conclure de cette expérience qu'une première pré-

paration diminue le délai minimum d'une seconde, comme si la première injection entraînait outre la préparation locale une modification générale, ou tout au moins symétrique de l'organisme. Nous retrouverons d'ailleurs plus loin des faits de ce genre.

Le résultat de l'expérience XV montrant que le délai minimum de la préparation active pouvant être de six heures, alors que celui de la transmission dite passive que nous avons observé dans l'expérience XIV est de quatre à cinq heures, la différence entre la préparation active et passive, si tant est qu'elle existe encore, est si réduite qu'il ne nous est plus per-

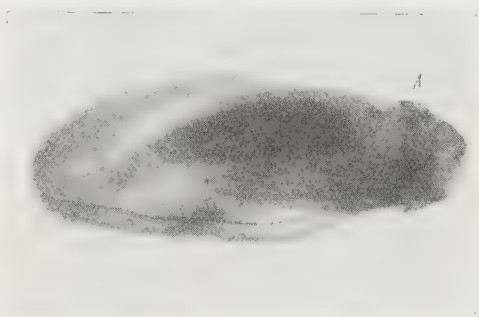


FIG. 44. — Réaction hémorragique « passive (?) » Expérience XIV.
Vue par transparence.

mis de les distinguer. Il est bien possible qu'il s'agisse réellement d'une transmission passive d'éventuelles substances concentrées dans l'éponge par l'animal activement préparé, mais il est tout aussi possible qu'il s'agisse chez le second lapin d'une préparation active par un peu de filtrat de *B. coli* V qui serait resté dans le jus d'éponge. Par conséquent, notre expérience qui nous avait paru si convaincante ne peut pas plus affirmer l'existence de transmission passive que celle de Shwartzman ne peut l'infirmer. Nous espérons bien d'ailleurs pouvoir tourner la difficulté prochainement.

Si nous avons cru devoir reproduire ici l'expérience malgré son absence de signification, c'est qu'elle nous a amenés à observer des faits très curieux. Lorsque nous faisons cette expérience — et nous l'avons répétée plusieurs fois — nous faisons

non seulement l'injection déchainante chez les lapins supposés préparés passivement par le jus d'éponge, mais nous la faisons aussi chez l'animal préparé activement et à qui nous avons retiré l'éponge. L'un de ceux-ci fit une réaction d'une exceptionnelle intensité s'étendant sur une surface plus grande qu'une paume de main. Cet animal survécut fort bien, mais quelques jours après nous avons observé que les vaisseaux de



FIG. 12. — Purpura bilatéral progressif. Début du processus.

ses oreilles étaient formidablement dilatés et cyanosés comme s'ils étaient dessinés sur la peau au crayon bleu.

Malgré cette vasodilatation énorme, ces oreilles étaient toutes froides. Il y avait donc une forte *stase capillaire*. Nous avons vainement essayé de le saigner à la veine marginale pourtant si dilatée de l'oreille, et l'avons saigné à la carotide. Le sang s'écoulait presque goutte à goutte, sans pression. Il y avait donc une *chute de la pression sanguine*. Nous avons fait la numération des plaquettes. De 6 à 700.000, chiffre normal, elles étaient tombées à 70.000, soit au $\frac{1}{10}$. Il y avait donc une *dimi-*

nution du nombre des plaquettes. Enfin, le sang récolté dans un verre à pied s'est sédimenté; le plasma surnageant, d'ailleurs tout à fait limpide, décanté, après une heure, est resté fluide jusqu'au lendemain. Un échantillon de ce plasma sou-



FIG. 13. — Purpura bilatéral progressif. Fin du processus.
Oreilles « fanées ».



FIG. 14. — Purpura bilatéral progressif. Fin du processus.
Oreilles « fanées ». Comparaison avec témoin normal.

mis à un courant de CO_2 s'est coagulé en vingt minutes. Il y avait donc *incoagulabilité du sang corrigible par le passage d'un courant de CO_2* . Or, ce sont là tous les symptômes du choc anaphylactique typique. Chose très curieuse, alors que dans le choc classique ces symptômes apparaissent aussitôt après l'injection déchaînante et sont fugaces, ici nous les avons remarqués plusieurs jours après la réaction, et plus de

vingt-quatre heures avant la saignée, et ils se seraient peut-être maintenus plus longtemps encore si l'animal n'avait succombé à cette saignée. Il y avait donc ici une sorte d'état de choc chronique.

Au cours de ces expériences, nous avons observé un autre fait curieux. Chez les lapins qui avaient été préparés à l'oreille à l'aide du jus d'éponge, on voyait apparaître quelques jours après, aussi bien et même surtout, chez ceux qui n'avaient pas réagi, et à l'oreille non préparée, comme à l'oreille préparée, des manifestations purpuriques débutant par les capillaires de



FIG. 15. — Vaisseaux d'une oreille normale vue par transparence.



FIG. 16. — Vaisseaux d'une oreille purpurique « fanée » vue par transparence.

l'extrémité des oreilles, puis ce purpura descendait le long des vaisseaux marginaux pour envahir finalement toute l'oreille. Celle-ci s'œdématisait, s'infiltrait peu à peu de sang, perdait de sa tonicité, et fortement alourdie, tombait progressivement d'abord du bout, puis de toute sa longueur le long de la tête du lapin en présentant un aspect de feuille fanée. Voici des photographies montrant ces « oreilles fanées » au début et à la fin du processus (fig. 12, 13, 14, 15, 16).

Le phénomène est bilatéral, comme si la préparation d'une oreille avait encore une fois sa répercussion sur l'autre. Peut-être est-ce là l'expression d'une transmission humorale ou des relations d'ordre nerveux qu'il importerait de rechercher.

Ces lésions purpuriques, quand elles sont intenses, sont très longues à guérir. Il arrive fréquemment que l'animal se cachectise et présente alors une ostéoporose extrême, avec une dose de calcium énorme dans le sang (150 au lieu de 100). Nous n'osons toutefois pas affirmer que cette ostéoporose et ce trouble du calcium soient la conséquence du phénomène purpurique, malgré la connexion que ces manifestations ont souvent entre elles (scorbut), il se pourrait qu'il ne s'agisse dans ces observations que d'une coïncidence, et seules des recherches systématiques avec examen du sang avant et après l'expérience pourraient nous éclairer à ce sujet. Nous y reviendrons dans une étude ultérieure.

Si l'on saigne ces animaux purpuriques, on constate que le nombre des plaquettes est sensiblement diminué; il est réduit de moitié, et même parfois au tiers, c'est-à-dire qu'on en trouve de 250.000 à 350.000 par millimètre cube. Il y a aussi un retard très marqué de la coagulation du sang, les globules rouges ayant le temps de se sédimenter et le plasma surnageant mettant parfois plus d'une heure à se coaguler, mais se coagulant rapidement par un passage de CO_2 .

Nous retrouvons donc encore une fois ici des troubles identiques à certains accidents du choc anaphylactique. Encore une fois, ces troubles ont une allure chronique.

Étant données ces diverses observations, nous nous sommes demandé si l'on ne pourrait pas désensibiliser des animaux au choc anaphylactique classique à l'aide d'une réaction de Shwartzman. On sait qu'on peut désensibiliser les animaux au choc sérique de deux façons : ou bien en épuisant petit à petit les anticorps cause du choc, par une série d'injections subintrantes ménagées d'antigène — c'est le procédé de Besredka qui parvient à désensibiliser complètement l'animal — ou bien en épuisant les capacités de réaction de l'organisme par un choc anaphylactoïde préalable tel qu'un choc peptoné ou un choc à l'anaphylatoxine. Le second procédé toutefois est moins efficace. C'est évidemment ce second mode de désensibilisation que nous pouvons espérer obtenir par une réaction de Shwartzman. A cet effet, nous faisons les expériences suivantes :

EXPÉRIENCE XVII. — Nous préparons de nombreux cobayes par injection intrapéritonéale de 2 cent. cubes de sérum de cheval. Deux mois plus tard, nous préparons 4 de ces cobayes (*a*, *b*, *c*, *d*) à l'aide d'une injection de 0 c. c. 5 de filtrat de *B. coli* V dans la peau du ventre. Le lendemain, à 11 heures, nous faisons une injection de 1 cent. cube de filtrat de *B. coli* V dans la cavité péritonéale de 3 de ces cobayes (*a*, *b* et *c*) ainsi que d'un cobaye anaphylactisé, mais non préparé (*e*). A 17 heures, 2 des 3 cobayes (*a* et *b*), qui ont reçu les injections, préparante et déchainante de filtrat, présentent une forte réaction hémorragique à l'endroit préparé, le troisième (*c*) par contre est négatif.

Nous injectons alors 0 c. c. 5 de sérum de cheval dans la jugulaire des 5 cobayes que nous venons de mentionner ainsi que d'un cobaye anaphylactisé mais n'ayant pas reçu de filtrat (*f*).

Voici les résultats (tous ces cobayes avaient sensiblement le même poids de 400 grammes environ).

1° Cobaye anaphylactisé témoin n'ayant pas reçu de filtrat (*f*).

Choc foudroyant.

2° Cobaye anaphylactisé ayant reçu seulement l'injection déchainante de filtrat (*e*).

Choc foudroyant.

3° Cobaye anaphylactisé ayant reçu seulement l'injection préparante de filtrat (*d*).

Choc foudroyant.

4° Cobaye anaphylactisé ayant reçu l'injection préparante et l'injection déchainante, mais n'ayant pas réagi (*c*).

Choc foudroyant.

5° Cobaye anaphylactisé ayant reçu les deux injections de filtrat et ayant fait la réaction (*b*),

Aucun symptôme de choc. L'animal survit.

6° Cobaye anaphylactisé ayant reçu les deux injections de filtrat et ayant fait la réaction (*a*).

Aucun symptôme. L'animal survit.

Cette expérience d'une netteté impressionnante nous montre qu'une réaction de Shwartzman fortement positive parvient à protéger complètement contre le choc sérique un cobaye anaphylactisé au sérum de cheval. Ce qui protège, c'est la réaction elle-même et non pas l'injection déchainante de filtrat ni la préparante, ni la combinaison des deux si celle-ci n'a pas donné lieu à une réaction hémorragique.

Le rôle protecteur de la réaction même se trouve confirmé par les résultats de l'expérience suivante faite de façon identique, mais où les réactions hémorragiques avaient été plus faibles. Dans ce cas, on verra que la protection est fonction de l'intensité de la réaction.

EXPÉRIENCE XVIII. — Même expérience que la précédente avec les mêmes témoins qui tous présentent un choc typique. Cette fois, 5 cobayes anaphy-

lactisés ont reçu les deux injections de filtrat de *B. coli* V à raison de 0 c. c. 2 en injection préparante dans la peau du ventre et de 1 cent. cube en injection déchainante dans la cavité péritonéale.

Voici, dans le tableau ci-dessous, les conditions de l'expérience et ses résultats :

COBAYES	POIDS en grammes	FILTRAT <i>B. coli</i> V		INTENSITÉ de la réaction	DOSES DE SÉRUM de cheval (en cent. cubes)	CHOC ANAPHYLACTIQUE
		dosés préparantes (en cent. cubes)	dosés déchainantes (en cent. cubes)			
A 56	350	0,2	1	Négative.	0,3	Choc mortel en quatre minutes. Poumons emphysémateux.
A 57	450	0,2	1	Douteuse.	0,4	Choc typique, mais non mortel. Sacrifié, poumons emphysémateux.
A 58	450	0,2	1	Douteuse.	0,45	Choc typique, mais non mortel. Sacrifié, poumons emphysémateux.
A 59	470	0,2	1	Positive faible.	0,5	Choc douteux. Emission d'urine. Sacrifié, poumons emphysémateux.
A 60	470	0,2	1	Positive.	0,55	Aucun choc. Sacrifié, poumons normaux.

A mesure donc que la réaction hémorragique est plus nette, la protection qu'elle exerce devient plus efficace. Ces résultats se trouvent confirmés encore par l'expérience suivante faite chez le lapin.

EXPÉRIENCE XIX. — Deux lapins anaphylactisés au sérum de cheval reçoivent 0 c. c. 3 de filtrat de *B. coli* V dans la peau du flanc. Le lendemain à 10 heures, on injecte 1 cent. cube de filtrat dilué au 1/10 dans les veines du premier (a) et 1 cent. cube de filtrat pur dans les veines du second (b) ; on injecte également 1 cent. cube de filtrat pur dans les veines d'un troisième lapin (c) anaphylactisé, mais dont la peau n'a pas été préparée à l'aide de filtrat. A 14 heures, les deux lapins préparés ont réagi, mais le premier présente une réaction beaucoup plus forte que le second. A 16 heures, on injecte 1 cent. cube de sérum de cheval dans les veines du troisième lapin anaphylactisé (c) lequel n'a reçu qu'une injection déchainante de filtrat pur. Aussitôt après, il émet des matières fécales et des urines, il se couche à plat ventre ; la respiration est spasmodique et gémissante, toutefois, au bout d'une heure, il est remis, mais meurt dans la nuit. A l'autopsie, les poumons ont une coloration mauve. On injecte de même 1 cent. cube de sérum de cheval dans les veines du lapin anaphylactisé (b) qui a aussi reçu une injection déchainante de filtrat pur, mais après avoir reçu la veille une injection préparante. Il a fait une réaction positive faible. Après quelques minutes, il se couche également, mais est visiblement moins atteint que le précédent. Il meurt cependant dans la nuit et à l'autopsie les poumons ont une coloration

tion mauve. Quant au lapin (*a*) qui, après une injection préparante de filtrat pur, puis une injection déchainante de filtrat dilué au 1/40 a donné une forte réaction hémorragique, on lui injecte 2 c. c. 5 de sérum de cheval dans les veines. Il continue à circuler normalement sans le moindre symptôme et survit.

Encore une fois ce n'est pas l'injection déchainante de filtrat qui a ici protégé contre le choc sérique, puisque l'animal le mieux protégé (*a*), a reçu dans les veines une dose de filtrat dix fois moindre que l'animal non protégé (*c*). C'est bien l'intensité de la réaction, puisque celui qui avait la plus forte réaction (*a*) a supporté impunément une dose de sérum deux fois et demie plus forte que celui qui, ayant moins nettement réagi (*b*), a souffert du choc.

Étant données les différences individuelles de sensibilité au choc sérique que manifeste le lapin, cette expérience prise isolément n'aurait sans doute pas de valeur, si elle n'avait été répétée avec le même résultat et si elle ne venait corroborer dans le même sens les expériences faites chez le cobaye. Il y aurait lieu d'ailleurs de refaire un plus grand nombre d'expériences chez le lapin en mesurant notamment les modifications de la pression sanguine. Il importerait aussi de préciser combien de temps après le début de la réaction la protection contre le choc sérique s'installe et quelle en est la durée.

Il était intéressant de voir si une réaction de Shwartzman désensibiliserait aussi contre le choc à l'anaphylatoxine au sérum gélosé de Bordet.

EXPÉRIENCE XX. — Deux cobayes préparés la veille à l'aide de 0 c. c. 3 de *B. coli* V ont reçu, ainsi qu'un cobaye témoin non préparé, 1 cent. cube de filtrat en injection déchainante dans la veine dorsale de la verge. Les deux premiers cobayes présentent, quatre heures après, une réaction de Shwartzman positive. Entre temps, on mélange soigneusement 15 cent. cubes de sérum de cobaye normal avec 3 cent. cubes d'une gelée d'agar à 5 p. 1.000. On laisse à 37°, pendant une heure, puis centrifuge énergiquement de façon à sédimenter la gélose. On injecte le sérum anaphylatoxique surnageant dans la jugulaire des 3 cobayes à raison de 5 cent. cubes par cobaye.

Le cobaye témoin fait un choc foudroyant typique avec tous les signes classiques, le grattage du museau, les spasmes thoraciques, les soubresauts et enfin les convulsions terminales. Les deux autres cobayes succombent également, mais avec des symptômes tout à fait différents; ces cobayes, porteurs d'une réaction de Shwartzman et injectés d'anaphylatoxine, tombent tout doucement sur le côté comme s'ils s'endormaient, puis meurent paisiblement sur place sans un mouvement. A l'autopsie, tandis que le cobaye témoin présente l'aspect caractéristique des poumons anaphylactiques qui

embrassent le cœur de toute leur masse emphysémateuse, les deux autres cobayes présentent au contraire des poumons parsemés de quelques pété- chies, mais tout à fait atélectasiés et aplatis au fond de la cavité thoracique en laissant tout le cœur à découvert.

On constate donc que, si une réaction de Shwartzman ne parvient pas à empêcher une forte dose d'une anaphylatoxine puissante de tuer les cobayes qui en sont porteurs, elle modifie néanmoins complètement la physionomie du choc au sérum gélosé.

Si une réaction de Shwartzman modifie la sensibilité des cobayes au choc anaphylatique sérique et au sérum gélosé, réciproquement, un choc anaphylactique sérique grave, mais non mortel, désensibilise-t-il les cobayes contre la réaction de Shwartzman?

EXPÉRIENCE XXI. — Cinq cobayes ayant reçu, six semaines auparavant, 1 cent. cube de sérum de cheval dans la cavité péritonéale, sont préparés dans la peau du ventre à l'aide de 0 c. c. 3 de filtrat de *B. coli* V. Le lendemain matin, nous leur injectons lentement dans la jugulaire à chacun 0 c. c. 2 de sérum de cheval, dilué dans 2 cent. cubes d'eau physiologique. Sur les 5 cobayes, 3 font un choc très grave mais dont ils se remettent, les deux derniers ne font pas de choc apparent. Chose curieuse, ces deux derniers présentaient précisément un érythème très accusé au niveau de la région préparée. Une heure plus tard, lorsque ces 5 cobayes sont revenus à l'état normal, nous leur injectons, dans la cavité péritonéale, 0 c. c. 8 de filtrat de *B. coli* V. Un des deux cobayes qui n'avaient pas fait de choc voit l'érythème qu'il portait s'accroître et devenir nettement hémorragique, le second ne réagit pas; quant aux 3 cobayes qui ont eu un choc particulièrement grave, ils présentent tous les 3 une réaction positive.

Contrairement à ce que l'on pourrait supposer, le choc anaphylactique sérique ne désensibilise pas le cobaye contre la réaction de Shwartzman.

La réaction de Shwartzman désensibilisera-t-elle contre le choc histaminique comme elle le fait contre le choc anaphylactique?

EXPÉRIENCE XXII. — On prépare 3 cobayes avec 0 c. c. 3 de filtrat dans la peau. Le lendemain, on injecte 1 cent. cube de filtrat dans la veine jugulaire ou dans la veine du pénis de ces 3 cobayes préparés (*a*, *b*, *c*), ainsi que d'un cobaye neuf (*d*). Six heures plus tard, 2 des cobayes préparés (*a*, *b*) font une très forte réaction de Shwartzman, le troisième (*c*), une réaction plus faible. On injecte dans la veine jugulaire de ces 4 cobayes (*a*, *b*, *c*, *d*) ainsi que d'un cobaye neuf (*e*), 1 milligramme d'histamine par kilogramme. Les deux cobayes qui n'ont pas de réaction, c'est-à-dire le cobaye neuf (*e*), ainsi que le cobaye qui

avait reçu une injection déchainante de filtrat sans injection préparante (*d*), présentent un choc identique auquel ils succombent lentement. Quant aux 3 cobayes qui ont réagi (*a*, *b*, *c*), les deux premiers, qui avaient une forte réaction positive, sont foudroyés en une minute; le troisième, qui avait une réaction plus faible, succombe aussi, mais plus lentement.

Ainsi donc si une réaction de Schwartzman désensibilise d'autant mieux contre le choc anaphylactique sérique qu'elle est plus intense, il semble qu'il en soit exactement le contraire à l'égard du choc histaminique; dans ce cas, les cobayes qui font la plus forte réaction de Schwartzman sont aussi ceux qui font le choc histaminique le plus violent.

TENTATIVES DE DÉSENSIBILISATION.

Comme nous l'avons vu plus haut, nous avons déjà essayé, mais en vain, de désensibiliser les animaux préparés en les soumettant à un choc sérique préalable. Nous avons essayé alors de les désensibiliser par d'autres moyens.

Et tout d'abord un animal qui a déjà réagi et est guéri peut-il réagir dans la suite? Burnet répond affirmativement: un même lapin peut réagir plusieurs fois successivement. Nous avons vérifié qu'il en est souvent ainsi et nous avons cru pouvoir en profiter pour utiliser plusieurs fois le même lapin pour des raisons d'économie, surtout lorsqu'il s'agissait d'expériences faites avec des filtrats de microbes différents. Toutefois, la possibilité de réactions répétées nous est apparue dans la suite comme un fait inconstant, sans que nous puissions pour le moment préciser la raison de cette inconstance; aussi avons-nous renoncé à employer plusieurs fois le même animal. D'ailleurs, il y a une certaine contradiction entre la possibilité de réactions répétées et le fait observé par Schwartzman que le sérum des animaux immunisés contre le microbe fournissant le filtrat neutralise les facteurs actifs de celui-ci. Il n'est pas douteux, en effet, qu'en répétant les tentatives de réaction on doit immuniser l'animal et le rendre inapte à réagir encore.

Si donc une réaction antérieure et guérie ne désensibilise généralement pas l'animal contre une réaction nouvelle, par contre une réaction récemment provoquée et encore en évolution ne serait-elle pas préventive?

EXPÉRIENCE XXIII. — Nous préparons 2 lapins à la cuisse droite avec 0 c. c. 3 de filtrat *B. coli* V et injectons le lendemain 1 cent. cube de filtrat *B. coli* V dans la veine. Toux deux font une forte réaction. Le jour suivant, nous préparons de même l'autre cuisse, puis après vingt-quatre heures nous avons fait une nouvelle injection déchainante. Les animaux paraissent très malades, ont de la diarrhée, mais survivent sans faire de nouvelle réaction au niveau de la seconde préparation.

Il semble donc que si une réaction antérieure guérie ne désensibilise généralement pas, une réaction en évolution, par contre, désensibilise l'animal contre une réaction nouvelle. Mais, encore une fois, cette expérience répétée plusieurs fois n'est pas constante.

Nous avons notamment fait l'observation suivante.

EXPÉRIENCE XXIV. — Un lapin ayant fait à l'endroit préparé une réaction positive légère à la suite d'une injection déchainante de 1 cent. cube de filtrat dilué au 1/1.000, nous lui faisons le lendemain une nouvelle injection déchainante de 1 cent. cube de filtrat pur cette fois; aussitôt la réaction qui la veille était légère se met à s'accroître et à devenir extrêmement prononcée.

Une première réaction légère en évolution n'a donc pas empêché une seconde réaction plus forte de se développer au même endroit. Aussi nous n'osons donc pas pour le moment tirer, à ce sujet, des conclusions formelles. Il en est d'ailleurs de même pour tous les autres modes de désensibilisation que nous avons essayés; aussi nous contenterons-nous, pour le moment, de signaler nos tentatives sans conclure.

Nous avons essayé de désensibiliser les animaux en pratiquant des injections intraveineuses subintrantes à doses d'abord extrêmement faibles puis progressivement croissantes, le résultat de ces essais déjà exposés plus haut (v. exp. X et XI) a été de provoquer des réactions généralisées au lieu d'une désensibilisation.

Nous avons essayé aussi de désensibiliser en faisant une première injection déchainante dans les veines pendant la période réfractaire de quatre à cinq heures qui suit l'injection préparante. Nous avons aussi essayé d'empêcher la réaction par l'administration d'hyposulfite de soude, d'adrénaline, d'éphédrine toujours avec des résultats trop inconstants pour pouvoir en tirer actuellement une conclusion sûre. Il y a lieu de refaire

ces expériences sur un nombre plus grand encore d'animaux.

Rappelons enfin ici que Burnet a obtenu une désensibilisation locale en injectant directement dans la peau à l'endroit préparé un peu de filtrat, avant de faire l'injection déchainante dans les veines. Nous avons pu vérifier cette expérience d'un intérêt considérable.

CONSIDÉRATIONS GÉNÉRALES.

Il résulte des faits que nous avons étudiés jusqu'ici que la réaction hémorragique de Sanarelli et de Shwartzman, sans se conformer aux conditions de l'anaphylaxie classique, affecte néanmoins avec ce phénomène d'incontestables relations. Nous avons, en effet, trouvé chez des animaux ayant fortement réagi et chez des lapins manifestant du purpura bilatéral des deux oreilles des symptômes caractéristiques du choc anaphylactique tels que de la stase capillaire, de la chute de la pression sanguine, de la thrombopénie, de l'incoagulabilité sanguine corrigible par un courant de CO_2 . Nous avons vu de plus qu'une réaction de Shwartzman positive protège contre le choc anaphylactique sérique et d'autant mieux qu'elle a été plus intense. Signalons encore que le lapin et le cobaye, animaux anaphylactisables, sont sensibles au phénomène de Shwartzman tandis que le rat et la souris, animaux non anaphylactisables, sont réfractaires au phénomène.

Une ressemblance fondamentale se retrouve encore dans la notion suivante. Comme dans l'anaphylaxie, la réaction est toujours identique à elle-même, quel que soit l'antigène employé, quel que soit l'effet primaire de cet antigène; en l'occurrence, la seconde injection entraîne toujours une même réaction hémorragique que ne provoquait pas la première. Si donc nous ne pouvons affirmer que la réaction de Sanarelli et de Shwartzman soit de l'anaphylaxie vraie, l'on peut dire qu'il s'agit d'une réaction allergique — terme pris dans son sens le plus large c'est-à-dire dans le sens d'une réaction autre que l'action primaire — et ayant toujours l'hémorragie comme caractère commun; c'est de l'*allergie hémorragique* ou, si l'on veut pour ne pas froisser les esprits attachés à la notion immuable de

l'allergie classique, de la « *paraallergie hémorragique* ».

Shwartzman, au contraire, penche en faveur d'une conception opposée. Pour lui (8) « les facteurs préparants sont doués
« du pouvoir de déterminer un état de sensibilité ou de vulnérabilité dans un certain territoire (peau et apparemment
« d'autres organes) à l'égard de substances qui ont une *toxicité primaire*, mais qui ne sont pas capables d'attaquer les
« tissus dans les conditions de résistance naturelle. Cette vulnérabilité — qui n'est pas le résultat d'un simple traumatisme — est probablement due à quelque trouble fonctionnel
« des cellules qui exige une courte période d'incubation pour
« apparaître et qui disparaît rapidement. Pour quelque raison
« inconnue, les cellules dans cet état sont susceptibles de
« lésions sévères et progressant rapidement, pourvu que les
« facteurs toxiques soient présents dans la circulation générale ». En vérité, cette façon de voir est plutôt la paraphrase du phénomène que son explication. En quoi consiste, en effet, cet « état de sensibilité ou de vulnérabilité », ce « trouble fonctionnel » des cellules? Pourquoi cette « période d'incubation »? Pourquoi aussi l'obligation, pour agir, que les « facteurs toxiques soient présents dans la circulation? » « Pour quelque raison inconnue » nous dit Shwartzman. Or, c'est précisément là qu'est tout le problème. Shwartzman nous dit aussi que la préparation n'est pas un simple traumatisme, ce que nous admettons avec lui, et qu'elle n'a pas de rapport avec l'anaphylaxie, ce que nous nous permettrons de mettre en doute à la suite de nos observations. En résumé, pour Shwartzman, la réaction hémorragique n'est pas un effet différent de la *toxicité primaire*, ce n'est pas une réaction allergique, mais bien, au contraire, une réaction synergique par le concours des facteurs préparants et des facteurs toxiques du filtrat.

Il est possible que Shwartzman ait raison. Il est certain que l'on pourrait ainsi facilement expliquer pourquoi toutes les souches microbiennes ne sont pas actives. Nous pouvons imaginer que seules seraient actives celles qui possèderaient déjà par elles-mêmes des propriétés hémorragipares. Et de fait, il est certain que le bacille typhique, le pneumocoque, le bacille de la coqueluche, par exemple, possèdent certaines propriétés hémorragipares. Mais oserait-on dire que le staphylocoque qui

est inactif est moins hémorragipare que certains streptocoques qui sont actifs?

L'hypothèse d'un phénomène purement accumulatif ou synergique, ne faisant que renforcer les effets toxiques du filtrat injecté, est peu vraisemblable pour les raisons suivantes. Tout d'abord il y a disproportion entre la dose parfois infime qu'il suffit d'injecter dans les veines d'un animal préparé pour avoir une réaction hémorragique et les doses relativement énormes que supporte un animal non préparé. S'il s'agissait d'un simple effet cumulatif, il n'y a pas de raison pour que la seconde injection doive être faite dans les veines; il n'y a pas de raison pour qu'elle ne soit pas active lorsqu'elle est portée directement dans la région préparée et, en tout cas, elle ne devrait certainement pas donner lieu alors à la désensibilisation observée par Burnet. Enfin, s'il ne s'agit que d'une exaltation des propriétés toxiques du filtrat, pourquoi est-ce seul l'effet hémorragipare qui est exalté? Pourquoi tel filtrat réinjecté ne donnerait-il pas plutôt de l'urticaire, un autre une réaction inflammatoire, un troisième une abcédation, un quatrième de la nécrose, selon les tendances individuelles propres des espèces microbiennes?

L'ensemble des faits connus jusqu'à présent nous semble s'interpréter le plus exactement de la façon suivante. Lorsque l'on introduit dans les tissus un antigène microbien, il se produit, à côté de l'action propre de l'antigène, une réaction de l'organisme. Peut-être y a-t-il à l'endroit injecté une libération d'histamine conformément aux idées de Lewis. Cette histamine provoquant la vaso-dilatation et l'augmentation de la perméabilité vasculaire favorise l'afflux dans cette région de leucocytes, peut-être des plaquettes, attirés d'autre part par un chimiotropisme positif. Il est vraisemblable que ce tropisme n'est pas exclusivement réservé aux cellules migratrices, mais que des substances humorales y participent. C'est ainsi que l'œdème charbonneux, les exsudats pleuraux infectieux sont riches en alexine. Il peut en être de même pour d'autres substances que l'alexine, d'autres facteurs humoraux, hétéroclites et non spécifiques, attirés par leur affinité pour les produits injectés. La région serait préparée lorsqu'il y aurait là une concentration suffisante de ces facteurs cellulaires et humoraux que, pour

objectiver, nous pourrions provisoirement appeler les « facteurs purpurigènes ». Ainsi s'expliquerait la période d'incubation. Si, à ce moment, on injecte dans les veines du filtrat actif, celui-ci à son passage dans la région préparée va être violemment sollicité par l'affinité des facteurs purpurigènes accumulés dans l'endothélium vasculaire et de l'autre côté de celui-ci. Une brusque combinaison va se faire d'abord au sein même de l'endothélium, y déterminant des altérations vasculaires par où les produits microbiens feront irruption ensuite dans la région préparée pour s'y fixer et, à travers ces brèches vasculaires, le sang envahira les tissus lésés. Une nouvelle libération d'histamine résultant du traumatisme, exagérant la vaso-dilatation, favorisera encore l'inondation sanguine.

Cette interprétation implique forcément que l'injection déchainante, pour être active, doit être faite dans la circulation comme c'est précisément le cas. Elle implique aussi que l'injection déchainante faite directement dans la peau à l'endroit préparé non seulement ne produira pas le phénomène, mais encore neutralisera les facteurs purpurigènes en dehors des vaisseaux et désensibilisera ainsi la région. Or, c'est précisément ce que montre la belle expérience de Burnet rappelée plus haut. Nous répondons ainsi à toutes les questions laissées sans réponse par l'interprétation de Shwartzman.

Il est bien possible aussi que de la brusque combinaison du filtrat actif avec les facteurs purpurigènes résulteront des conditions analogues à celles du choc anaphylactique avec production de quelque anaphylatoxine ou « angiotoxine » nuisible pour les vaisseaux, soit d'un flocculat capable selon les conceptions de Lumière d'exciter les terminaisons des fibres vasodilatatrices.

Nous serions au regret si le lecteur devait avoir l'impression que nous présentons cette hypothèse comme définitive. Nous ne l'estimerions au contraire valable que si nous pouvions mettre en évidence l'existence de ces facteurs purpurigènes ou encore si nous pouvions fabriquer *in vitro* de « l'angiotoxine ». Il ne s'agit, en vérité, que d'une hypothèse de travail toute provisoire que nous avons émise afin de rattacher le phénomène de Shwartzman à des notions connues. Mais il est probable qu'au lieu de trouver son explication dans le passé, le phénomène de

Shwartzman ouvre plutôt des horizons vers l'avenir, vers des notions encore inconnues qu'il nous incite à rechercher. Il y aurait lieu, non seulement de poursuivre l'étude des facteurs humoraux du phénomène, mais encore celle des facteurs cellulaires et notamment des plaquettes, sans négliger non plus l'analyse histologique des tissus où se déroulent les différentes phases de la réaction. Enfin, l'on ne peut oublier les facteurs nerveux du phénomène dont on peut déjà, dès à présent, entrevoir l'importance. Nous reviendrons sur ces différents aspects de la question dans d'autres mémoires.

La fixation secondaire dans la région préparée des produits microbiens injectés dans les veines nous rappelle certains faits connus. Au cours d'une longue expérimentation clinique, Dujardin a étudié avec ses collaborateurs Duprez et Descamps toute une série de manifestations d'allergie cutanée non spécifiques qu'avec Duprez il a appelés des « hétéro-allergies ». Pour Dujardin (9), lorsqu'un antigène est introduit dans la peau, il s'y fixe de façon plus ou moins durable. Cette fixation, il l'appelle une « pexie », pexie lâche ou pexie cryptique, selon le degré de fixation. Cette région devient dès lors pour un certain temps perméable à diverses substances introduites dans le sang, à des anticorps notamment, mais aussi à des produits toxiques introduits par l'alimentation. Grâce à cette perméabilité de la région préparée, ces produits introduits par la voie veineuse viennent électivement s'y fixer et provoquent des réactions anaphylactoïdes comme du dermatisme, de l'érythème, de l'urticaire, des phlyctènes, du prurit, etc... Ce phénomène de fixation secondaire par voie veineuse, Dujardin l'appelle de « l'hyperpexie ».

Il y a déjà longtemps, Borrel (10) a eu l'incontestable mérite de montrer, le premier, le rôle des parasites dans la genèse du cancer. Or, ayant fait l'observation qu'un rat parasité par un ver avait développé simultanément le cancer et la lèpre, il a fait l'expérience suivante. Il a infesté avec de la lèpre plusieurs rats parasités et a retrouvé les bacilles lépreux accumulés tout autour du parasite. Il en a conclu que le parasite pouvait servir de point de fixation aux bacilles lépreux et par conséquent aussi à l'éventuel virus du cancer.

Levaditi et Nicolau (11) ont constaté que si l'on injecte des virus filtrables, comme la vaccine, à des rats porteurs d'épithélioma, ces virus viennent se fixer de façon élective dans le tissu tumoral.

Récemment, Ascoli (12) a donné à des phénomènes de fixation secondaire le nom « d'anachorèse ». Il explique notamment de la sorte la vaccination par le BCG. Il a constaté que si l'on injecte du bacille de Koch à des animaux porteurs d'un foyer de BCG, ces bacilles de Koch viennent se fixer électivement dans ce foyer et y subissent localement l'attaque des phagocytes qui y sont accumulés; la localisation des bacilles de Koch dans le foyer de BCG préservant ainsi l'organisme de la tuberculisation. L'anachorèse est donc aussi une forme d'hyperpexie.

Si notre interprétation devait se confirmer, un nouveau rapprochement avec l'anaphylaxie s'imposerait. De même que les

accidents anaphylactiques sont les révélateurs de l'existence des anticorps de l'immunité acquise, les accidents de l'allergie hémorragique seraient les révélateurs de l'existence de facteurs encore inconnus de la lutte de l'organisme contre les agents microbiens. Ce serait tout un nouveau mécanisme de l'immunité qui nous serait dévoilé, mécanisme trouvant précisément son importance primordiale dans la précocité même de sa mise en œuvre. S'il en est ainsi, le phénomène de l'allergie hémorragique ne serait pas qu'une curiosité expérimentale, mais il devrait jouer un rôle incontestable dans les infections. C'est la vérification de cette anticipation que nous allons trouver dans la troisième partie de ce mémoire, consacré au phénomène de Sanarelli et de Shwartzman dans les infections.

TROISIÈME PARTIE

L'hétéro-allergie hémorragique ou le phénomène de Sanarelli et de Shwartzman dans les infections.

Dans les pages qui précèdent, nous avons étudié les conditions du phénomène de Sanarelli et de Shwartzman. Nous en avons retiré la notion que ce phénomène sans être sans doute une manifestation de l'anaphylaxie classique a, avec celle-ci, d'évidentes relations et peut être tout au moins considéré comme une réaction d'hétéro-allergie dont l'hémorragie est le caractère commun. Nous en avons inféré que ce phénomène devait dès lors être l'expression accidentelle de quelque mécanisme d'immunité précoce encore inconnu et devrait donc pouvoir se retrouver au cours des infections. Dans le but de vérifier cette anticipation, nous avons essayé de remplacer dans le phénomène de Shwartzman l'injection préparante d'un filtrat microbien artificiellement produit à l'étuve par l'inoculation d'une infection typique.

L'on pourrait penser que le phénomène de Sanarelli contient déjà en lui-même cette démonstration puisque, dans ce cas, la préparation s'obtient non pas avec un filtrat microbien, mais avec une culture vivante de vibrions cholériques. Une telle conclusion serait à vrai dire abusive, car nous n'ose-

rions prétendre que la préparation a été obtenue ici par une infection qui n'a pas encore eu le temps de se déclarer, plutôt que par les seuls produits microbiens. Plus précieuse à cet égard, est l'intéressante observation de Paul Bordet (13). Ce dernier, désirant, en effet, étudier l'influence de la vaccination par le BCG sur des infections autres que la tuberculose, avait injecté du *B. coli* à des cobayes antérieurement vaccinés au BCG. Or, ces animaux succombant à cette injection, l'autopsie montre que les ganglions viscéraux sont fortement augmentés de volume, congestionnés et même hémorragiques, présentant fréquemment l'aspect d'un véritable caillot. Paul Bordet a rapproché cette observation du phénomène de Sanarelli et de Shwartzman. Pourtant, dans le phénomène de Shwartzman, la préparation de la peau à l'aide d'un filtrat microbien s'établit en quelques heures et ne dure guère

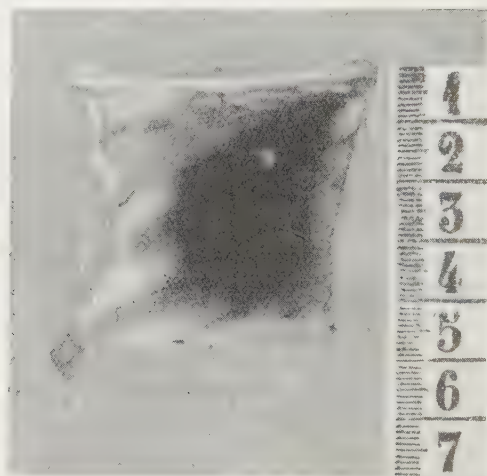


FIG. 17. — Réaction hémorragique au niveau de l'inoculation cutanée du second vaccin charbonneux. Vingt-quatre heures après l'injection déchaînante de filtrat *B. coli*.

plus de quarante-huit heures, tandis que dans l'observation de Paul Bordet la préparation n'apparaît qu'après plusieurs jours et se maintient pendant plusieurs semaines.

Nous avons porté notre choix sur une infection dont les conditions se rapprochent le plus possible de celles du phénomène de Shwartzman : l'infection charbonneuse.

EXPÉRIENCE XXV. — Inoculons dans la peau du ventre de 4 lapins 0 c. c. 5 de culture de second vaccin charbonneux. Dès le lendemain, apparaît à ce niveau de l'œdème charbonneux. A ce moment, injectons dans les veines 1 cent. cube de filtrat de *B. coli* V. 3 de ces lapins meurent en quelques

heures sans avoir eu le temps de réagir; mais le 4^e survit jusqu'au lendemain. A l'autopsie, l'on trouve une réaction hémorragique identique à celle du phénomène de Schwartzman, non seulement au niveau de l'inoculation (fig. 17), mais encore au niveau d'un ganglion inguinal (fig. 18), et d'un ganglion axillaire qui avaient déjà été infectés.

Nous avons répété l'expérience en injectant dans les veines du filtrat dilué au 1/10, de façon à éviter les réactions trop rapidement mortelles et nous avons retrouvé les lésions hémorragiques caractéristiques aux endroits infectés. Ainsi se trouve

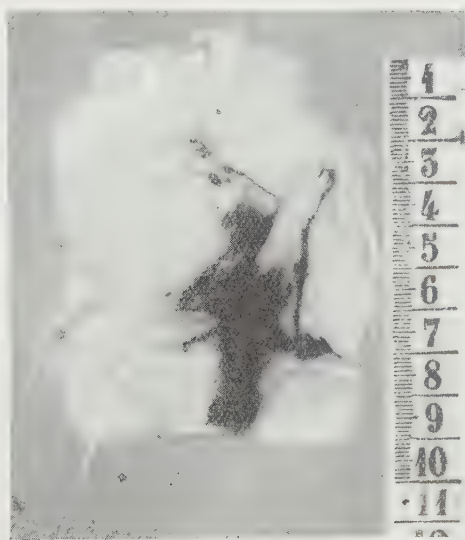


FIG. 18. — Réaction hémorragique au niveau d'un ganglion inguinal du même lapin.

démonstré que les facteurs du phénomène de Schwartzman interviennent dès le début d'une infection comme le charbon. Il importait de voir si cette observation avait un caractère général et si on pourrait la retrouver dans une autre infection cutanée due à un virus filtrable, par exemple, comme la vaccine.

Nous devons à l'amabilité du professeur Ledingham, directeur du Lister Institute, une pulpe vaccinale adaptée au lapin par de nombreux passages. Avec cette pulpe, nous avons frictionné la peau du dos rasée d'un lapin et trois jours plus tard, au moment où celui-ci présente un fort érythème non encore

pustuleux, nous le sacrifions et récoltons, par raclage de la région infectée, une nouvelle provision de pulpe vaccinale fraîche.

EXPÉRIENCE XXVI. — Avec la pulpe que nous venons de récolter, nous faisons une émulsion dans de l'eau physiologique et en frictionnons la peau rasée de l'oreille de 3 lapins. Cinq jours plus tard, il ne s'est pas produit d'érythème, mais quelques pustules séparées. Nous injectons 1 cent. cube de filtrat de *B. coli* V dans les veines de 2 des 3 lapins. Le lendemain, on constate chez ceux-ci que les pustules sont toutes entourées d'une belle aréole hémorragique et que leur centre est nécrosé et noir. Il semble bien que l'infection ait

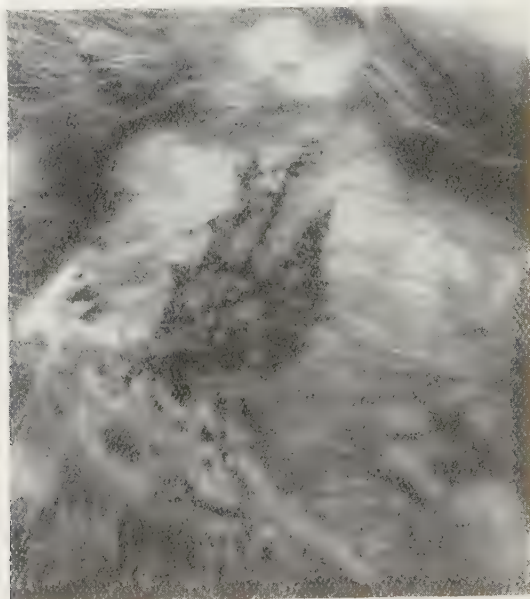


FIG. 49. — Réaction hémorragique au niveau d'un érythème vaccinal quelques heures après l'injection déchainante de filtrat de *B. coli*.

avorté, car ces pustules se flétrissent aussitôt tandis que chez le 3^e lapin elles continuent à évoluer normalement.

L'aspect hémorragique des pustules évoque aussitôt la variole hémorragique et la clavelée noire. On peut donc se demander si ces formes particulières ne sont pas dues à des infections associées.

EXPÉRIENCE XXVII. — Avec la même pulpe, nous frictionnons la peau épilée et scarifiée de la fesse de 6 lapins. Trois jours après, l'érythème caractéris-

lique se développe chez tous également bien. Nous injectons 1 cent. cube de filtrat de *B. coli* V dans les veines de 2 de ces lapins. On ne tarde pas à voir la couleur de cet érythème passer du rose au rouge, puis au pourpre, puis devenir lie de vin en quelques heures (fig. 19). Le lendemain, toute la région vaccinée est nécrosée et va devenir noire comme du goudron. Aucune pustule ne se développe si ce n'est quelques-unes au pourtour de la lésion. Chez les 4 autres lapins, tout l'érythème se couvre de pustules confluentes. Le cinquième jour de l'inoculation, nous injectons 1 cent. cube de filtrat à 2 de ces lapins. Très rapidement, chez 1 de ces lapins, toutes ces pustules s'entourent d'une auréole hémorragique et le lendemain toute la région est uniformément infiltrée de sang, puis elle ne tarde pas à se nécroser. L'autre lapin ne réagit pas, mais ses pustules se flétrissent plus tôt que normalement. Quant aux 2 derniers lapins, nous les injectons seulement au huitième ou neuvième jour de l'inoculation, au moment où les pustules commencent à se dessécher. Malgré cela, ils donnent une réaction hémorragique typique.

Il résulte de ces expériences que, comme le charbon, la vaccine met en œuvre, dès le début de l'infection, les facteurs du phénomène de Schwartzman. Mais tandis qu'à la suite d'une injection de filtrat microbien dans la peau la préparation de celle-ci ne dure que quarante-huit heures, dans la vaccine l'état de susceptibilité se maintient pendant toute la semaine que dure l'infection. Il nous a paru, d'autre part, que la réaction semble juguler ou tout au moins hâter l'évolution de l'infection vaccinale. Si ce fait devait se vérifier, il pourrait présenter un certain intérêt pratique.

La réaction hémorragique, provoquée au moment de l'érythème vaccinal, a un caractère d'intensité si impressionnant, que nous voyons dans la vaccine un matériel de choix pour l'étude du phénomène et nous comptons bien y recourir pour essayer d'élucider certains points du problème. Mais il importe d'écarter la possibilité d'une cause d'erreur ; c'est que la pulpe vaccinale dermique, bien que récoltée au moment où l'érythème n'a pas encore de pustules, ne contient pas que du virus vaccinal, mais encore d'autres microbes et de façon très prépondérante du staphylocoque. Il se pourrait donc que le phénomène observé soit dû, non pas à la vaccine, mais à ces microbes associés ou à leurs produits. Nous avons donc isolé de la pulpe le staphylocoque qui représente de loin la contamination la plus importante et nous avons fait l'expérience suivante :

EXPÉRIENCE XXVIII. — Nous injectons 3 lapins dans la peau de la fesse avec 0,5 cent. cube de culture de vingt-quatre heures en bouillon, du

staphylocoque isolé de la pulpe vaccinale. Deux jours plus tard, lorsque à l'endroit inoculé s'est développée une forte inflammation avec une pointe purulente, nous injectons 1 cent. cube de filtrat de *B. coli* V dans les veines des 3 lapins. Aucun ne présente de réaction.

Par conséquent, pas plus que le filtrat de staphylocoque, l'infection staphylococcique ne met en jeu les facteurs de la réaction de Shwartzman. Ce fait n'est peut-être pas très favorable à la conception que nous avons suggérée et pourtant n'est-il pas précisément en relation avec le fait si curieux que l'infection staphylococcique se réensemence et récidive constamment. En tout cas, il en résulte que la réaction positive, obtenue avec la vaccine, n'est certainement pas due aux staphylocoques qui la souillent. D'ailleurs, nous allons donner la preuve directe du rôle de l'infection vaccinale dans la réaction, en nous adressant non plus à la dermovaccine, mais à la testiculo-vaccine qui, elle, est absolument pure. Cette tentative nous montrera d'autre part, une fois de plus, que la peau n'est pas le seul organe sensible à la réaction.

EXPÉRIENCE XXIX. — Nous avons reçu, en 1930, de l'Institut vaccinal de Madrid, une testiculo-vaccine glycinée qu'après lavage dans un peu d'eau physiologique nous broyons en une émulsion assez épaisse. Nous en injectons 0,3 cent. cube dans le testicule d'un lapin. Trois jours plus tard, le testicule inoculé est doublé de volume et œdématié. Nous saignons l'animal et prélevons aseptiquement le testicule vacciné que nous broyons aussitôt et réduisons en une émulsion dont, après en avoir vérifié la stérilité sur gélose et en bouillon, nous injectons 0,3 cent. cube dans le testicule de 3 lapins de 2 kilogrammes. Lorsque les testicules inoculés sont en pleine évolution vaccinale, nous injectons aux 3 lapins 1 cent. cube de filtrat de *B. coli* V. Les 3 lapins succombent le lendemain et le surlendemain. A l'autopsie, on constate que le testicule inoculé a violemment réagi. Il en sort une sérosité sanglante de teinte violacée tandis que lui-même a l'aspect d'un gros caillot (fig. 20 et 21). Cette réaction hémorragique remonte le long du cordon, se disperse sur la vessie et sur le cordon de l'autre testicule, envahit la séreuse du gros intestin et va jusqu'à l'épiploon qui est couvert de caillots, tandis que la cavité péritonéale est remplie de sang (fig. 20). Les ganglions inguinaux et mésentériques sont aussi fortement hémorragiques, ainsi que le thymus et, chez un des lapins, le poumon. Des lapins témoins inoculés de la même façon, mais non injectés de filtrat dans les veines, sont morts vers le quatrième ou cinquième jour ou ont été sacrifiés. Ils ne présentent que de la réaction inflammatoire du testicule, du cordon et du péritoine, sans aucune manifestation hémorragique.

Nous pouvons donc déduire de cette expérience répétée d'ailleurs avec le même résultat à l'aide d'injection intravei-

nense de filtrat dilué au 1/10, que l'infection vaccinale du testicule à l'aide du virus vaccinal pur met en jeu les facteurs de la réaction de Shwartzman d'une façon tout à fait remarquable.

Étant donné ce résultat, nous nous sommes adressés à la troisième forme d'infection vaccinale : la neurovaccine avec



FIG. 20. — Réaction hémorragique vésicale dans l'infection testiculo-vaccinale, vingt-quatre heures après l'injection déchainante de filtrat de *B. coli*. Expérience XXIX.

l'idée préconçue d'observer des lésions hémorragiques du cerveau capables de nous éclairer peut-être sur la pathogénie de certaines hémorragies cérébrales. A cet effet, nous avons fait l'expérience suivante :

EXPÉRIENCE XXX. — De la neurovaccine glycinée provenant également de l'Institut vaccinal de Madrid, préalablement lavée à l'eau physiologique

et dont la stérilité a été vérifiée, nous sert à inoculer un lapin par injection sous-durale dans le cerveau. Le troisième jour, l'animal grince des dents; le quatrième jour il est paralysé puis succombe au début du cinquième jour après avoir présenté des crises convulsives. A l'autopsie, on ne trouve nulle part de lésion hémorragique. Avec la matière cérébrale aseptiquement prélevée et émulsionnée par broyage dans de l'eau physiologique stérile, nous inoculons 4 lapins dans le cerveau à l'aide de 0,3 cent. cube de l'émulsion dont la stérilité a été contrôlée sur gélose et en bouillon. 2 de ces lapins manifestent, dès le deuxième jour, de l'abattement, puis, le

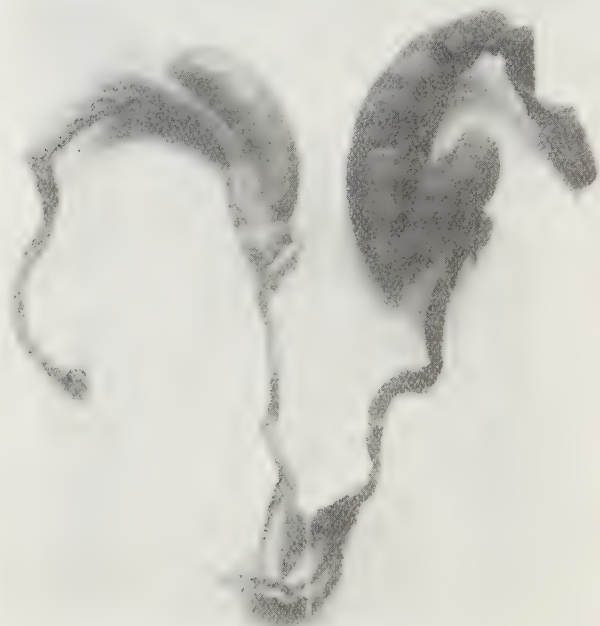


FIG. 21. — Le testicule droit est le testicule qui avait été inoculé.
Il est hémorragié ainsi que le cordon.

troisième jour, du grincement des dents et des paralysies locales. Nous leur injectons aussitôt 1 cent. cube de cultures filtrées de *B. coli* dans les veines. Ils meurent en moins de vingt-quatre heures sans présenter de lésion hémorragique ni du cerveau ni de la moelle; chez l'un d'eux, on trouve des pétéchies discrètes dans la paroi de l'estomac. Les 2 autres lapins présentent les symptômes de l'infection un jour plus tard, c'est-à-dire entre le troisième et le quatrième jour. Nous leur injectons 1 cent. cube de filtrat de *B. coli* à la fin du quatrième jour, c'est-à-dire, donc, plus tardivement que chez les deux premiers. Le lendemain, ils sont morts et ne présentent aucune lésion hémorragique du névraxe; mais nous trouvons chez tous les deux de fortes taches hémorragiques dans la paroi de l'estomac et de l'intestin et dans le

diaphragme. Chez l'un d'eux, les mêmes hématomes existent dans la paroi du cœur et dans le poumon ; de plus, les ganglions inguinaux et axillaires, les glandes sous-maxillaires et une des parotides sont fortement hémorragiques.

Comme les autres formes d'infection vaccinale, la neuro-vaccine donne donc lieu à des manifestations hémorragiques à la suite d'une injection de culture filtrée de *B. coli*, quand cette injection est faite à un moment suffisamment avancé de la maladie.

Chose curieuse, bien qu'il s'agisse ici d'une encéphalite et que le cerveau comme la moelle soient remplis de virus vaccinal, nous n'observons aucune lésion hémorragique du névraxe, alors que d'autres organes comme l'intestin, l'estomac, les ganglions et les glandes salivaires, par exemple, en sont atteints. Il semble donc que le système nerveux central ne soit pas apte à réagir. Cette conclusion, nous allons la voir se vérifier dans une autre infection du névraxe à virus filtrable : la rage.

EXPÉRIENCE XXXI. — Nous pratiquons chez 13 lapins l'inoculation intracérébrale de virus fixe. Ces lapins tombent paralysés entre le quatrième et le cinquième jour. Nous injectons, à ce moment, 1 cent. cube de filtrat de *B. coli* dans les veines de 5 de ces lapins enragés, 1 cent. cube du même filtrat dilué au 1/100 chez 2 autres et 1 cent. cube de filtrat de vibrion cholérique chez 2 autres encore ; les 4 lapins restants, non injectés, servent de témoins et meurent vers le huitième ou neuvième jour sans présenter nulle part de lésion hémorragique. Les 9 lapins enragés injectés de filtrats meurent dans les vingt-quatre à trente-six heures qui suivent l'injection, c'est-à-dire vers le sixième ou septième jour de l'infection. 2 des 5 lapins injectés de filtrat de *B. coli* et 1 des 2 lapins injectés du filtrat dilué présentent des réactions hémorragiques considérables particulièrement intenses au niveau de divers segments de l'intestin (fig. 22), au niveau de l'estomac et de l'épiploon. Par contre, nous n'avons jamais trouvé de lésion hémorragique du névraxe, exactement comme dans le cas de la neurovaccine.

Le phénomène dans la rage affecte un aspect fort semblable à celui qu'il offre dans la neurovaccine. Bien qu'il s'agisse encore une fois d'une infection du névraxe, celui-ci échappe aux lésions hémorragiques. En est-il de même avec d'autres encéphalites, telles que l'encéphalite herpétique et l'encéphalite léthargique ? Nous avons voulu le vérifier, mais nous avons dû y renoncer, car les animaux témoins auxquels nous avons inoculé ces virus ont déjà montré des lésions hémorragiques si marquées, notamment dans le poumon et le foie, que nous

avons craint de ne pouvoir distinguer ce qui revenait au phénomène de Sanarelli et de Shwartzman de ce qui était dû aux propriétés hémorragiques de l'infection elle-même.

Au cours de ces recherches, nous avons à maintes reprises trouvé donc, non seulement des lésions hémorragiques de la



FIG. 22. — Réaction hémorragique du colon chez un lapin enragé injecté de filtrant de *B. coli*. Expérience XXXI.

peau comme dans le phénomène de Shwartzman, mais aussi de multiples et importantes lésions viscérales et notamment intestinales comme dans le phénomène de Sanarelli. Ce fait vient largement confirmer l'identité des deux phénomènes que nous avons, d'autre part, démontrée au début de nos recherches.

Nous avons constaté que tous les organes ne sont pas également sujets aux réactions hémorragiques. A part la peau, il y a trois viscères qui sont particulièrement vulnérables, ce sont l'intestin, le poumon et le rein. Ce sont précisément les trois organes où l'on retrouve le plus fréquemment les lésions hémorragiques de l'anaphylaxie, notamment chez le chien. Comme autres organes qui sont fréquemment le siège des hémorragies, il faut tout d'abord citer les ganglions lymphatiques et la moelle osseuse, le thymus qui, sans présenter de fortes hémorragies, est le siège d'une hyperhémie tout à fait remarquable avec souvent de l'infiltration sanguine. Nous avons déjà fait des examens histologiques de tous ces organes et y avons fait des observations fort curieuses qui confirment l'extraordinaire intensité du phénomène. Mais nous consacrerons un mémoire ultérieur à cet aspect histologique de la question. Il y a par contre trois organes où jamais nous n'avons vu la moindre réaction hémorragique; ce sont le cerveau, le foie et les capsules surrénales. Or, les physiologistes nous enseignent que précisément les deux premiers organes n'ont pas de réactions vaso-motrices. Peut-être est-ce là le motif de leur absence de réaction au phénomène de Sanarelli et de Shwartzman, ce qui serait une nouvelle indication en faveur du rôle des vaso-moteurs dans le phénomène.

Dans la deuxième partie de ce mémoire, nous avons déjà répondu à l'objection que les manifestations hémorragiques observées pourraient être imputées à la seule toxicité primaire du filtrat. En effet, jamais nous n'avons observé ces hémorragies lorsque nous injectons des doses même beaucoup plus élevées de filtrat de *B. coli* V dans les veines de lapins non préparés. Une fois seulement, nous avons observé une exception surprenante à cette règle mais qui, en fin de compte, est venue confirmer pleinement notre point de vue. Il s'agissait, en effet, de 3 lapins neufs que nous avions voulu préparer à l'aide d'une injection intraveineuse de 0,5 cent. cube de filtrat de *B. coli*. Or, le lendemain, au moment de pratiquer l'injection déchaînante, nous avons eu la surprise de trouver ces lapins morts et présentant déjà des lésions hémorragiques étendues des viscères et particulièrement de l'estomac. Après avoir été un moment déconcertés, nous en avons déduit que ces lapins,

malgré leur apparence normale au moment de l'injection, devaient être en incubation de maladie infectieuse. Et de fait, nous avons vu dès le lendemain se déclarer une épidémie de diarrhée mortelle, mais non hémorragique par elle-même, parmi les autres lapins du clapier où ces animaux avaient été prélevés. Il ne s'agissait pas d'une exception, mais au contraire d'une confirmation de notre façon de voir.

Nous avons voulu voir ce qui se passait dans une infection chronique très importante, la syphilis.

EXPÉRIENCE XXXII. — Nous devons à l'obligeance de M. le professeur Bessemans (de Gand) un lapin porteur d'un syphilome du testicule inoculé depuis trois à quatre semaines. Nous avons prélevé le testicule syphilitique aseptiquement et en avons transplanté de petits fragments dans le testicule de 6 lapins de 2 kilogrammes. 5 de ces lapins sur 6 présentent à leur tour des syphilomes qui, après sept à huit semaines, sont ulcérés chez 2 des lapins, tandis qu'ils sont encore fermés chez les 3 autres. Nous les injectons tous les 5 à l'aide de 1 cent. cube de filtrat de *B. coli* V dans les veines. Le lendemain, il n'y a aucune modification au niveau des testicules, il n'y a pas la moindre apparence de réaction. Trois jours plus tard, nous les réinjectons avec une dose double et même triple de filtrat (de 2 à 3 cent. cubes). Les animaux paraissent souffrants, mais ne réagissent pas davantage. L'un d'eux succombe. A l'autopsie, nous ne trouvons aucune lésion hémorragique, pas même à l'endroit du syphilome, ni des ganglions voisins. Nous sacrifions les 4 autres lapins et leur autopsie est tout aussi négative.

Devant ces résultats négatifs, nous avons eu soin de vérifier que le filtrat n'était pas en défaut et qu'il provoquait des réactions de Shwartzman intenses chez des lapins préparés dans la peau avec le même filtrat.

Nous n'avons donc pas réussi dans les conditions de notre expérience à produire une réaction hémorragique au cours de l'infection syphilitique expérimentale du lapin. On sait, en vérité, que la syphilis présente des formes dites allergiques et des formes dites anergiques, c'est-à-dire inaptes à donner lieu à ces réactions allergiques que les premières formes manifestent. Le syphilome du lapin donne bien l'impression d'être anergique, aussi n'est-il pas autrement étonnant qu'il ne réagisse pas au phénomène de Shwartzman si celui-ci est, comme nous le suggérons, une réaction d'allergie hémorragique.

Dans la première partie de ce mémoire, nous avons vu qu'une tumeur comme le lipo-sarcome du cobaye donnait lieu à une réaction hémorragique lorsque, après l'avoir préparé à l'aide

d'une injection au sein de la tumeur d'un peu de filtrat de *B. coli* V, nous faisons le lendemain une injection déchainante du même filtrat dans les veines.

Lorsque, plus tard, nous avons vu que l'on peut obtenir des réactions hémorragiques chez des animaux préparés non seulement à l'aide de filtrat microbien, mais encore à l'aide d'une infection à virus filtrable comme la vaccine, nous nous sommes demandé s'il était bien nécessaire de « préparer » le sarcome à l'aide d'un filtrat pour obtenir une réaction positive. On sait, en effet, que beaucoup d'auteurs pensent que les tumeurs sont de nature parasitaire et dues à quelque virus encore inconnu. Si cela était vrai, il se pourrait que le sarcome fût tout préparé par ce virus ; il suffirait alors d'une simple injection déchainante de filtrat microbien dans les veines pour produire une réaction hémorragique dans la tumeur. Or, c'est exactement le résultat que nous avons obtenu.

EXPÉRIENCE XXXIII. — Chez 5 cobayes porteurs de sarcomes de la grosseur d'un œuf de poule, nous injectons 1 cent. cube de filtrat de *B. coli* dans la veine jugulaire. 2 meurent dans les vingt-quatre heures en présentant un état hémorragique intense de toute la tumeur, 2 autres sont sacrifiés après quarante-huit heures et présentent la même lésion. Le cinquième est laissé en vie pour voir l'évolution de la tumeur. Huit jours plus tard, l'animal succombe et présente une tumeur mi-hémorragique, mi-nécrosée. La réaction hémorragique est limitée uniquement au sarcome et diffuse un peu dans le tissu conjonctif péritumoral ; aucun organe ne présente la moindre pétéchie.

Il est évident que les manifestations hémorragiques résultant de la présence de produits microbiens tels que les produits du *B. coli* dans le sang d'animaux porteurs d'infections ou même de tumeur est de nature à jeter quelque lumière sur les multiples lésions hémorragiques que l'on trouve en clinique, telles, par exemple, celles de la pancréatite hémorragique, celles aussi des purpura infectieux et tant d'autres. On peut se demander, par exemple, si les poussées purpuriques que l'on observe souvent ne sont pas dues chez des porteurs de lésions infectieuses locales, chroniques ou latentes, à des libérations, des décharges dans le torrent circulatoire de microbes ou de leurs produits lors de quelque incident occasionnel, une simple constipation par exemple. Nous nous permettons cette suggestion simplement pour attirer éventuellement l'attention des cliniciens sur

le phénomène de Sanarelli et de Shwartzman comme facteur pathogénique.

Il résulte de ces recherches que nous trouvons la réaction hémorragique de Sanarelli et de Shwartzman dans toute une série d'infections, qu'il s'agisse d'une infection aiguë ou chronique, d'une infection à microbe visible ou à virus filtrable, qu'il s'agisse d'infections cutanées ou d'infections viscérales. Nous voyons ainsi vérifiée l'anticipation que notre interprétation du phénomène nous avait logiquement amené à proposer. Aurait-elle eu seulement ce résultat que nous ne regretterions pas de l'avoir émise. Et si, dans la suite, elle doit être précisée ou même probablement soumise à revision, nous espérons que les multiples vérifications et combinaisons expérimentales qu'elle suggère nous apporteront des faits nouveaux et des notions nouvelles.

Conclusions.

1° Le phénomène de Sanarelli et le phénomène de Shwartzman, bien que différant légèrement dans leurs conditions de production, sont identiques;

2° Les principes microbiens actifs ne sont pas dialysables;

3° La dissolution par le bactériophage ou par le Streptothrix de microbes inactifs, comme le staphylocoque, ne libère pas de principes actifs. Inversement, la dissolution de microbes actifs, comme le *B. coli*, ne détruit pas leurs principes actifs;

4° Conformément à l'opinion de Shwartzman, seuls les produits de certains microbes sont actifs. A la liste de ceux étudiés par Shwartzman, il faut ajouter le vibron cholérique. Il nous paraît que, conformément à l'opinion de Burnet, les principes actifs sont plutôt les endotoxines que les exotoxines;

5° La ricine, toxine végétale, nous paraît devoir agir comme facteur préparant;

6° Les tentatives de préparation de la peau par l'eau distillée ou par les solutions hypertoniques (NaCl 20 p. 100) sont restées négatives;

7° Tous les lapins d'une même nichée ne sont pas également sensibles;

8° Les lapins jeunes réagissent mieux que les lapins âgés, mais les nouveau-nés ne semblent pas sensibles avant l'âge de trois semaines;

9° Le cobaye réagit comme le lapin. Par contre, le rat et la souris sont insensibles;

10° La réaction provoquée dans la peau de l'oreille présente certains avantages et certaines particularités; on peut notamment observer un purpura bilatéral bien qu'une des deux oreilles seulement ait été préparée;

11° La peau n'est pas le seul organe sensible. En faisant la préparation par la voie veineuse, on obtient la généralisation des lésions hémorragiques avec prédilection au niveau de l'intestin, du rein et du poumon;

12° Le liposarcome du cobaye est sensible au phénomène;

13° L'injection déchaînante est active, même à très faible dose (jusqu'au 1/1.000 de centimètre cube);

14° Le temps minimum nécessaire à la préparation peut n'être que de cinq à six heures. Une première préparation diminue le temps nécessaire à une seconde préparation faite quelques heures après;

15° La réaction hémorragique ressemble exactement à celle produite par l'injection locale de sérum antiplaquette. L'injection intraveineuse ménagée de 1 cent. cube de sérum antiplaquette au lapin ne désensibilise pas celui-ci à la réaction; au contraire, elle favorise celle-ci;

16° Lorsque la réaction est très forte, on peut observer des répercussions générales sur la circulation, identiques aux accidents du choc anaphylactique, à savoir: de la stase capillaire, de la chute de la pression sanguine, de la thrombopénie, de l'incoagulabilité du sang rectifiable par le passage d'un courant de CO₂. Ces répercussions ont un caractère durable;

17° Lorsqu'on fait l'injection déchaînante cinq ou six heures seulement après avoir préparé une oreille, il se déclare généralement après quelques jours un purpura progressif et intense des deux oreilles avec l'apparition des mêmes troubles circulatoires, notamment la thrombopénie et le retard de la coagulation corrigé par un courant de CO₂;

18° Une réaction hémorragique positive protège le cobaye et le lapin contre le choc anaphylactique sérique, et d'autant plus efficacement que la réaction a été plus forte ;

19° Une réaction positive modifie complètement les manifestations du choc au sérum gélosé de Bordet ;

20° Une réaction positive ne protège pas contre le choc histaminique ;

21° Un choc anaphylactique sérique grave, mais non mortel, ne protège pas contre la réaction hémorragique ;

22° Différentes tentatives de désensibilisation, ainsi que des injections d'adrénaline, d'éphétonine et d'hyposulfite de soude, n'ont donné que des résultats trop inconstants pour en tirer des conclusions ;

23° Le phénomène de Sanarelli et de Schwartzman, bien que ne se conformant pas aux conditions de l'anaphylaxie classique, présente avec celle-ci d'incontestables relations ; il s'agit vraisemblablement d'une réponse de l'organisme, d'une réaction d'hétéro-allergie dont l'hémorragie est le caractère commun, expression de quelque mécanisme d'immunité non spécifique encore inconnu. Il est à prévoir que ces réactions doivent donc pouvoir se produire au cours des infections ;

24° L'injection intraveineuse de filtrat de *B. coli* provoque une réaction hémorragique intense chez les animaux préparés à l'aide d'infections les plus diverses, cutanées ou viscérales, aiguës ou chroniques, à microbes visibles ou à virus filtrables.

Dans le charbon, on observe la réaction non seulement au niveau de l'inoculation, mais encore au niveau des ganglions infectés.

Dans la dermo-vaccine, les pustules s'entourent d'une auréole hémorragique tandis que la pustule se flétrit. Si l'injection est faite au début, alors que l'érythème vaccinal ne présente pas encore de pustules, l'érythème devient entièrement hémorragique, puis se nécrose sans développement des pustules. Dans la testiculo-vaccine, le testicule est transformé en un caillot et les réactions hémorragiques remontent le long du cordon dans la cavité péritonéale, sur la vessie, l'intestin jusqu'à l'épiploon. Dans la neuro-vaccine, on observe des réactions hémorragiques dans les viscères, particulièrement dans l'intestin, mais on

n'observe aucune réaction dans le névraxe. Il en est de même dans la rage.

Le système nerveux central, le foie et les capsules surrénales sont apparemment les seuls organes ne manifestant pas les réactions hémorragiques. La syphilis du lapin n'a pas donné lieu au phénomène, par contre le liposarcome du cobaye réagit à l'injection intraveineuse de filtrat de *B. coli* sans préparation préalable.

Ces faits confirment nos prévisions et attirent l'attention sur le rôle pathogénique probable que le phénomène étudié ici joue dans les multiples manifestations hémorragiques observées en clinique.

(Laboratoire de Bactériologie
de la Faculté de Médecine de Bruxelles.)

BIBLIOGRAPHIE

- [1] SHWARTZMAN. *Journ. of. exp. med.*, **48**, 1928, p. 247; **49**, 1929, p. 593; **50**, 1929, **51**, 1930, p. 574; *Klin. Woch.*, 1930, p. 1925 et 1974.
- [2] F. M. BURNET. *Journ. of Pathol. and Bacter.*, **34**, 1931, p. 45.
- [3] GRATIA et LINZ. *C. R. de la Soc. de Biol.*, **106**, 1931, p. 1290, 1293; **107**, p. 234, 236, 902, 1579, 1580; **108**, p. 238, 425, 427.
- [4] SANARELLI, *Ces Annales*, **38**, 1924, p. 11.
- [5] GRATIA, *C. R. de la Soc. de Biol.*, **93**, 1923, p. 1040.
- [6] FRISCH. *Arch. Int. méd.*, vol. XLVI, 1930, p. 410.
- [7] ROSKAM. *C. R. de la Soc. de Biol.*, **105**, 1931, p. 937 et 939.
- [8] SHWARTZMAN. *Journ. exp. med.*, vol. LI, 1930, p. 580.
- [9] DUJARDIN. *Arch. Dermato-syphiligraph.*, **2**, fasc. 4, p. 552.
- [10] BORREL. *Bull. du Cancer*, **49**, 1930.
- [11] LEVADITI et NICOLAU. *C. R. de l'Acad. des Sciences*, **174**, 13 mars 1922; *Bull. Inst. Pasteur*, **37**, p. 443.
- [12] ASCOLI, *Ces Annales*, **47**, 1931, p. 29.
- [13] BORDET (Paul). *C. R. de la Soc. de Biol.*, **106**, 1931, p. 1231.

**SUR QUELQUES PROPRIÉTÉS CHIMIQUES,
MICROSCOPIQUES ET SÉROLOGIQUES
DES FILTRATS DE VOILES DE BACILLES DE KOCH
ET DE LA FLÉOLE SUR LE MILIEU DE SAUTON**

par C. NINNI.

Certains expérimentateurs persistant à mettre en doute l'existence de la filtrabilité du bacille de Koch, nous avons cherché à étudier comparativement les propriétés bio-chimiques des filtrats de voiles de culture sur Sauton, préparés de façon différente, en vue de déterminer les rapports qu'elles peuvent présenter avec l'ultravirus tuberculeux.

I. — LES LIPIDES ET LES COLLOÏDES DES FILTRATS.

Trois ballons de culture de bacille tuberculeux sur Sauton, souche bovine Vallée âgée de douze jours, ont été décantés soigneusement, et les voiles qu'ils contenaient ont été dissociés par agitation avec des billes de verre : l'un pendant cinq minutes, les deux autres pendant vingt minutes.

Puis, après avoir agité le premier ballon, on y introduisit 25 cent. cubes d'eau physiologique et on filtra aussitôt sur bougie Chamberland L₂.

Les voiles, agités pendant vingt minutes, ont été repris : l'un avec 25 cent. cubes d'eau physiologique, l'autre avec 25 cent. cubes d'eau salée à 5 p. 100, laissés pendant vingt-quatre heures à la glacière, et, enfin, filtrés, d'abord sur papier Laurent ordinaire, puis sur bougie.

Le même traitement a été appliqué à des voiles de cultures en Sauton de bacilles paratuberculeux de la fléole âgées de six jours, sauf que la quantité d'eau physiologique ou salée à 5 p. 100 ajoutée a été de 45 cent. cubes par ballon.

Les lipides (cires, glycérides ou graisses neutres, phosphamino-

lipides et éthers des stérols), analysés et dosés par M. Sandor(1) de la Section de Chimie des Laboratoires de la tuberculose, ont oscillé entre 0 gr. 50 et 0 gr. 65 p. 1.000, le minimum concernant les filtrats préparés par agitation brève et aussitôt filtrés, et le maximum les filtrats préparés par agitation prolongée et repris avec l'eau salée à 5 p. 100.

Les lipides ou les extraits alcoolo-éthérés ne présentent pas les caractères physico-chimiques des cires et des graisses neutres, selon M. Sandor.

Les protéines vraies, mises en évidence par M. Sandor par la réaction d'Adamkiewicz, se trouvent dans tous les filtrats, mais à l'état de traces dans les filtrats préparés par agitation brève, et en quantité au moins quatre fois plus forte dans les filtrats préparés par agitation prolongée, puis repris avec de l'eau salée à 5 p. 100. Le sel extrait donc les protéines des corps bacillaires par exosmose. C'est pourquoi le séjour à la glacière est plus indispensable que l'agitation prolongée pour obtenir de bons filtrats. Ce fait ressort également de ce que le filtrat salé du bacille de la fièvre est plus riche en protéines que le filtrat salé correspondant du bacille tuberculeux, car l'exosmose est plus active pour le premier (dont beaucoup d'éléments sont peu ou ne sont pas acido-résistants) que pour le bacille de Koch (souche Vallée) qu'entoure une coque ciro-graisseuse très peu perméable, particulièrement dans les vieilles cultures.

Il est douteux, d'après nos essais, que le sel favorise la filtration des protéines à travers la bougie.

Les colloïdes, y compris les protéines précipitables par l'alcool, l'acide nitrique (épreuve de Heller), l'acide trichloracétique, sont assez abondants : en ajoutant III gouttes d'acide trichloracétique à 2 c. c. 5 de filtrat, on obtient à froid une opalescence plus ou moins intense, suivie de floculation : en deux minutes pour les filtrats préparés par agitation prolongée et repris avec l'eau salée à 5 p. 100 ; en vingt minutes pour les filtrats bien agités et repris avec l'eau physiologique ; en soixante minutes pour les filtrats agités pendant cinq minutes et aussitôt filtrés.

La quantité de substance coagulable par l'acide trichloracétique, appréciée directement, est de 0 gr. 05 à 0 gr. 10 p. 1.000

(1) Nous remercions bien cordialement M. Sandor pour l'aide précieuse et pour les renseignements qu'il nous a donnés.

pour les filtrats préparés par agitation pendant cinq minutes et aussitôt filtrés; 0 gr. 15 à 0 gr. 20 p. 1.000 pour les filtrats préparés par agitation prolongée et repris avec l'eau physiologique; 0 gr. 30 à 0 gr. 40 p. 1.000 (jusqu'à 0 gr. 50 p. 1.000 pour le b. de la fiéole) pour les filtrats préparés par agitation prolongée et repris avec de l'eau salée à 5 p. 100.

Ces colloïdes présentent deux propriétés particulières :

a) Avec l'acide trichloracétique à chaud ils se résolvent et par refroidissement consécutif ils se précipitent de nouveau; ils se rapprochent ainsi des albumoses.

b) La quantité de précipité que l'on obtient par l'acide trichloracétique à froid est supérieure à celle que l'on obtient par l'acide trichloracétique à chaud; ce qui prouve qu'une fraction, peut-être de nature protéinique, reste en solution après ébullition.

II. — L'ULTRAVIRUS DANS LES DIFFÉRENTS FILTRATS.

L'inoculation dans les ganglions cervicaux du cobaye et la culture de ces organes en milieu de Sauton suivant la technique que nous avons indiquée (1) permet de constater pour le bacille de la fiéole que les filtrats préparés par agitation brève et aussitôt filtrés donnent des résultats assez régulièrement négatifs (2 sur 2). Les filtrats du même germe, préparés par agitation prolongée, repris par l'eau physiologique et laissés pendant vingt-quatre heures à la glacière avant la filtration sur bougie, donnent des résultats assez fréquemment positifs (2 sur 3); les filtrats préparés par agitation prolongée, repris par l'eau salée et laissés pendant vingt-quatre heures à la glacière avant la filtration, donnent des résultats régulièrement positifs (3 sur 3).

Avec des filtrats de bacilles tuberculeux (souche Vallée, voiles sur Sauton âgés de huit jours), nous avons même obtenu 1 résultat positif par microculture indirecte, selon la technique que nous ferons connaître prochainement, en partant des ganglions directement inoculés et prélevés quinze jours après l'inoculation du filtrat préparé dans l'eau salée à 5 p. 100. Les autres méthodes de préparation de filtrats de voiles de Sauton

(1) C. NINNI. *C. R. Soc. Biol.*, 107, 1931, p. 618.

ont toujours donné des résultats négatifs (5 sur 5), bien entendu par culture indirecte.

III. — LES LIPIDES LIBRES DES BACILLES DE KOCH
ET DE LA FLÉOLE
NE TRAVERSENT PAS LES BOUGIES CHAMBERLAND L
EPREUVE CHIMIQUE DIRECTE.

Quelques auteurs ont avancé que les granulations et les bacilles acido-résistants, visibles dans les ganglions directement inoculés avec les filtrats, dérivent des cires bacillaires. Capuani (1), par exemple, qui a effectué toute une série de recherches *in vitro* et *in vivo* avec le bacille tuberculeux et le bacille de la fléole, a observé des grains acido-résistants dans 10 à 40 p. 100 des ganglions cervicaux directement inoculés avec les filtrats du bacille de Koch. Mais il prétend que ces granulations sont constituées par des particules cireuses qui auraient traversé la bougie, car elles disparaissent au cours des passages en série de ganglion en ganglion. Or, d'une part, la démonstration de l'ultravirus tuberculeux est basée sur la présence de *bacilles typiques* dans les ganglions lymphatiques des animaux inoculés. D'autre part, on sait que la filtration sur bougie de porcelaine réduit les propriétés antigènes des composés protéiques tels que la tuberculine (A. Boquet, L. Nègre et J. Valtis) (2) et qu'elle supprime totalement les propriétés antigènes des extraits alcooliques de bactéries telles que les vibrions cholériques (Prausnitz) (3); on peut donc en inférer que les bougies ne permettent pas le passage des lipoides libres, à plus forte raison des cires, et que l'opinion de Capuani n'est pas soutenable.

Malgré ces faits, et bien que l'examen chimique des filtrats ait démontré que les lipides décelables par l'analyse chimique n'ont pas les propriétés des cires et des graisses, nous avons fait l'expérience suivante : le foie broyé d'un cobaye sain a été repris avec 20 parties d'eau physiologique et filtré sur papier Laurent ordinaire. Une partie du liquide a été filtrée

(1) CAPUANI, G. E. *Boll. Ist. Serot.*, Milanese, **10**, 1931, p. 275-315.

(2) BOQUET, NÈGRE et VALTIS. *C. R. Soc. Biol.*, **89**, 1928, p. 45.

(3) PRAUSNITZ. Cité par BORDET, *Traité de l'Immunité*, 1920, p. 473. Masson.

tel quelle sur bougie Chamberland L_2 ; l'autre partie a été portée à 38-40°, versée dans un mortier de porcelaine, et additionnée dans la proportion de 1 gramme pour 100 d'un mélange de cires, graisses et lipoides du bacille de Koch extraits à chaud par l'alcool et l'éther. On a ensuite filtré ce mélange sur bougie L_2 . Le dosage des lipides totaux, effectué par M. Sandor, a donné des résultats identiques pour les deux filtrats (0 gr. 32 p. 1.000).

Par conséquent, seuls les lipides hépatiques ont traversé la bougie, entraînés par la protéine sous forme de complexe lipo-protéidique; par contre, les cires, les graisses et les lipides libres du bacille de Koch que nous avons ajoutés n'ont pas filtré.

Du reste, on peut se convaincre de la manière suivante que les graisses libres sont retenues par les bougies L_2 : à une partie du foie broyé de cobaye préparé de la même façon et filtré sur papier Laurent, on ajoute de l'huile d'olive dans la proportion de 5 p. 100 et on agite énergiquement pendant quinze minutes (l'autre partie du foie reste telle quelle comme contrôle). On filtre ensuite sur bougie Chamberland L_2 sous pression de 20 à 30 centimètres en agitant toujours l'émulsion: pas une seule trace d'huile ne traverse la bougie poreuse. L'examen chimique (M. Sandor) a montré que la quantité des lipides du filtrat foie-huile est de 0 gr. 30 p. 1.000, tandis que la quantité des lipides du filtrat foie-contrôle est de 0 gr. 32 p. 1.000. Cette légère différence peut tenir à la méthode chimique; mais, plus exactement, elle peut être attribuée à ce fait que l'huile, qui ne filtre pas, entraîne une partie des protéines du foie et avec elles des lipides du foie. L'observation directe prouve l'exactitude de cette hypothèse, car dans le godet externe de la bougie on retrouve l'huile à demi solidifiée et noirâtre, entraînée par les protéines et l'hémoglobine.

IV. — L'OBSERVATION MICROSCOPIQUE DES FILTRATS CONFIRME LES DONNÉES DE LA CHIMIE ET DE L'ÉPREUVE BIOLOGIQUE.

5 cent. cubes de chaque filtrat par bougie, différemment préparé, ont été versés dans une boîte de Petri stérile qui, inclinée et sans couvercle, a été laissée à l'étuve à 38° jusqu'à évapora-

tion complète (environ douze heures). Le sédiment desséché, légèrement jaunâtre pour le bacille de la fléole, contient des cristaux de sel, assez nombreux dans le filtrat préparé par l'eau salée à 5 p. 100. Avec une pipette Pasteur on reprend par une goutte d'eau distillée une partie du sédiment et on l'étale sur une lame. Si on colore la lame par la méthode de Ziehl-Neelsen, on observe une substance amorphe bleue et de très fins granules submicroscopiques légèrement bleuâtres. Ces grains sont rares dans les filtrats préparés par agitation pendant cinq minutes et aussitôt filtrés; ils sont plus nombreux dans les filtrats préparés par agitation prolongée, particulièrement dans les filtrats préparés avec de l'eau salée à 5 p. 100. Aucun d'eux ne renferme de granulations acido-résistantes. Il va sans dire que si l'on traite de la même façon le sédiment du filtrat sur papier, on observe non seulement la substance amorphe et les granulations bleues très nombreuses, mais aussi quelques bacilles acido-résistants et de nombreuses granulations acido-résistantes libres, surtout pour le bacille de la fléole.

Sans préjuger de savoir si les fins granules légèrement bleus des filtrats résultent de la précipitation des protéines bacillaires, on peut affirmer cependant, d'une part, qu'ils sont d'autant plus nombreux que la protéine bacillaire est plus abondante et que le filtrat est plus riche en ultra-virus décelable; d'autre part, qu'on ne peut mettre en évidence de granulations acido-résistantes dans le sédiment des liquides bacillifères filtrés sur bougie.

V. — LA FIXATION DU COMPLÉMENT DÉMONTRE QUE,
DANS LES FILTRATS SUR BOUGIE,
LES LIPOÏDES SE TROUVENT SOUS FORME DE COMPLEXES
LIPO-PROTÉIDIQUES.

Les filtrats précédents desséchés ont été séparément repris par l'alcool à 96°, à raison de 1 cent. cube d'alcool par centimètre cube de filtrat, et conservés dans des tubes bouchés. Le sel se dépose et les protéines ainsi que les autres colloïdes bacillaires flocculent. On laisse à la température ambiante pendant cinq à six jours en agitant de temps en temps et on filtre ensuite sur papier Laurent ordinaire.

On compare le pouvoir antigène de ces extraits alcooliques avec le pouvoir antigène des mêmes filtrats laissés tels quels, en opérant de la manière suivante :

Chaque extrait alcoolique est dilué au 1/10 avec de l'eau physiologique et éprouvé à doses de 0 c. c. 1, 0 c. c. 2, 0 c. c. 4, 0 c. c. 6, 0 c. c. 8, 1 cent. cube avec 0 c. c. 1 de sérum antituberculeux de cheval en présence de trois doses d'alexine, selon la technique de Calmette et Massol.

Les filtrats correspondants sont titrés dans les mêmes conditions. Mais, au préalable, pour éviter toute cause d'erreur dans la comparaison, ils sont dilués au 1/10 avec huit parties d'eau physiologique et une partie d'alcool à 96°.

Les résultats de ces épreuves, plusieurs fois répétées avec différents filtrats, ont toujours été très nets : absence complète de pouvoir antigène pour les filtrats, même à la dose de 1 cent. cube, pouvoir antigène marqué avec les extraits alcooliques des mêmes filtrats.

La fixation, démontrable par la lecture après vingt-quatre heures, a été complète jusqu'aux doses de 0 c. c. 6, incomplète avec les doses de 0 c. c. 4 et parfois avec 0 c. c. 2 ; toujours négative avec 0 c. c. 1.

Le pouvoir antigène est plus marqué pour les extraits des filtrats de bacilles tuberculeux que pour ceux de la fléole ; légèrement plus fort pour les filtrats préparés par agitation prolongée et salés à 5 p. 100 que pour les filtrats correspondants préparés avec de l'eau physiologique. Le pouvoir antigène moyen des extraits de filtrats dilués au 1/10 est à peu près égal au pouvoir antigène de l'antigène de Boquet et Nègre dilué au 1/20.

Ces expériences prouvent que les lipoides contenus dans les filtrats ne sont pas libres, mais se trouvent sous la forme de complexes lipo-protéïdiques, que l'alcool concentré est capable de libérer quand on opère l'extraction sur des filtrats desséchés. Au contraire, les filtrats sur papier Laurent qui renferment des granulations acido-résistantes possèdent un faible pouvoir antigène dû à la présence d'une petite quantité de lipoides libres.

De l'ensemble de ces constatations, nous pouvons tirer les conclusions suivantes :

1° Les filtrats des voiles de culture sur Sauton du bacille de Koch et du bacille de la fièvre présentent les réactions des protéines et des lipides;

2° La quantité de protéines et de substances colloïdales, précipitables par l'acide trichloracétique — et même par l'alcool et l'acide nitrique — qu'ils contiennent dépend du mode de préparation des suspensions bacillaires aqueuses, du temps de contact entre les microbes et l'eau et de la quantité de sel ajouté à l'eau;

3° Les filtrats sont d'autant plus riches en ultra-virus décelable par l'épreuve biologique qu'ils sont plus riches en protéines et en substances colloïdales;

4° Les cires, les graisses et les lipoïdes libres des suspensions ne traversent pas les bougies Chamberland L₃, comme le démontrent les épreuves chimique, microscopique et sérologique;

5° Les lipoïdes se trouvent dans les filtrats sous la forme de complexes lipo-protéidiques que l'alcool à 96° libère quand on le fait agir sur les filtrats desséchés à 38°;

6° Du fait qu'ils ne contiennent ni cires, ni graisses, ces lipoïdes des filtrats (libérables par l'alcool) constituent un bon antigène; cependant leur pouvoir fixateur est inférieur de moitié à l'antigène méthylique de Boquet et Nègre.

(Institut Pasteur. Laboratoire de recherches sur la tuberculose.)

**INFLUENCE DE LA LÉCITHINE ET DE LA CHOLESTÉRINE
(EN CONCENTRATION
CORRESPONDANT A CELLE DE CES SUBSTANCES
DANS LA BILE DE BŒUF)
SUR LA BIOLOGIE DU BACILLE TUBERCULEUX HUMAIN**

par M. le Dr Iwo LOMINSKY.

I

Les relations entre le bacille tuberculeux et les substances lipoides, ainsi que les relations entre les lipoides et le bacille tuberculeux, sont des problèmes très fréquemment discutés. Tout d'abord la manière dont se comportent les bacilles tuberculeux envers les colorants et leur composition chimique [1, 2] a naturellement suggéré beaucoup de recherches sur les relations directes et indirectes qui peuvent exister entre ces bacilles et les lipoides.

De nombreux examens chimiques et sérologiques ont montré que le taux de lécithine et de cholestérine dans le sang ou le sérum des hommes et des animaux atteints de tuberculose varie dans des proportions qui correspondent à la gravité de la maladie [3, 4]. L'étude chimique des organes d'animaux et d'hommes infectés de tuberculose ou même inoculés avec des bacilles tués ont révélé un accroissement de la teneur du foie en lécithine, en même temps qu'une augmentation du taux de phosphore contenu dans cette lécithine [5]. Quelques auteurs ont même essayé d'expliquer la fréquence des localisations tuberculeuses dans certains organes par le dépôt dans ces organes d'une grande quantité de substances lipoides qui favorisent le développement du bacille tuberculeux [6]. Beaucoup d'autres ont signalé la bactériolyse, la perte de l'acido-résistance et un grand affaiblissement de la virulence des bacilles dans les émulsions bacillaires mises au contact de la lécithine, ou de substances qui contiennent une grande quantité de lécithine.

thine d'origine animale ou végétale. Citons à cet égard les travaux de Deycke et Much [7], Calcaterra [8], Isabolinsky et Gito-witsch [9-12].

Il est vrai que Bayer [13] et Zeuner [14] ont tâché de prouver que ces résultats ne sont dus qu'à des circonstances de second ordre, par exemple aux produits acides de la décomposition des lipoïdes, à une susceptibilité particulière des bacilles à l'acidité du milieu en présence des lipoïdes, enfin, à une technique défectueuse. Malgré tout, la grande majorité des auteurs considère toujours les lipoïdes et spécialement la lécithine comme étant la véritable cause des phénomènes précités; ils lui attribuent la détermination de la bactériolyse, de la perte de l'acido-résistance et de la virulence. Il faut mentionner spécialement à ce sujet le travail de Platonoff [15]. Celui-ci est d'avis que la lécithine et la cholestérine ont sur les bacilles tuberculeux une influence qui empêche leur développement et qui exerce une action bactéricide. Il pense que les bacilles tuberculeux ne peuvent pas assimiler directement les lipoïdes, et que, tout au plus, la lipase produite par les bacilles peut éliminer des acides gras non saturés de la lécithine et que ces acides gras affaiblissent la virulence des bacilles. Plus tard Calmette [16, 17] a signalé le caractère lécithinophile des bacilles tuberculeux et de leurs produits, en démontrant l'influence neutralisante de la lécithine sur la tuberculine. Bien que Bayer [13] soit d'une opinion différente, les travaux qui suivirent ont prouvé que l'opinion de Calmette était juste. Pour élucider le rôle des lipoïdes au cours de l'infection tuberculeuse, ainsi que dans des buts thérapeutiques, on a étudié l'influence des injections de cholestérine sur les animaux tuberculeux. Les résultats ont été peu encourageants [18, 19]. Plusieurs auteurs ont obtenu des bacilles d'une virulence très atténuée en soumettant une émulsion de bacilles tuberculeux à l'action d'organes broyés riches en matières lipoïdes [20-23]. D'autres, ayant essayé de cultiver les bacilles tuberculeux sur des organes dont la richesse en substances lipoïdes était variable [20, 23, 24, 25], ont obtenu des résultats intéressants. Ils ont constaté que le bacille tuberculeux ne se développait que sur les organes riches en lipoïdes ou qu'au moins le développement sur ces organes était plus abondant que sur d'autres,

et que la différence des résultats obtenus était en rapport avec la richesse ou la pénurie de ces organes en lipoides.

On a également essayé de cultiver le bacille sur des milieux auxquels on ajoutait directement des lipoides, soit de la cholestérine [27], soit de la lécithine, de la cholestérine ou les deux comme le faisait Nyren [28], soit seulement de la lécithine [26], ou bien, comme nous l'avons fait nous-même, une combinaison de lécithine et de cholestérine [29].

Pour obtenir un développement plus rapide et plus abondant, on a recommandé les milieux les plus variés dans la composition desquels entrent des substances qui contiennent des lipoides, spécialement de la lécithine en notable quantité. Tout d'abord je cite la bile de bœuf proposée par Calmette et Guérin [30] qui contient 0,1 p. 100 de lécithine et 0,07 p. 100 de cholestérine; puis le foie, proposé par Cancik et Mazepowa [31], enfin tous les milieux à l'œuf, où celui-ci entre en entier ou dans lesquels entre seulement le jaune, substance contenant, comme on sait, d'énormes quantités de lécithine [32-40].

Sur tous ces milieux le développement des bacilles tuberculeux est plus rapide et plus abondant que sur les autres, et chacun sait que, sur le milieu de Calmette, sa souche a perdu sa virulence.

Tous les auteurs, Calmette en tête, attribuent les résultats obtenus sur les milieux sus-mentionnés tout d'abord aux lipoides, spécialement à la lécithine, ensuite à d'autres facteurs [50].

En résumé, je voudrais attirer l'attention sur ce fait que, d'une part les lipoides paraissent exercer une influence prépondérante sur la bactériolyse, sur la perte de l'acido-résistance et sur l'affaiblissement de la virulence: et cette influence est exercée par le contact avec la lécithine à un état de concentration très élevée, jusqu'à 5 et 10 p. 100, ou par le contact à l'étuve avec des organes broyés contenant des lipoides. D'autre part, ces mêmes lipoides agissent, même en faible proportion, sur la rapidité et sur l'abondance du développement des bacilles.

Nous voyons donc que les effets de la lécithine sont différents, suivant sa concentration, et c'est un fait bien compréhensible du point de vue de la biologie générale. Ajoutée en faible proportion, la lécithine stimule la rapidité et l'abondance

du développement; en concentration élevée, elle donne une bactériolyse plus ou moins complète et, en conséquence, une perte totale ou partielle de l'acido-résistance et de la virulence. Avec les faibles proportions, on n'a jamais remarqué de perte d'acido-résistance, ce qui se serait manifesté tout d'abord pour la souche BCG qui, de toutes les souches, est celle qui a été cultivée le plus longtemps sur un milieu contenant de la lécithine.

Dans le présent travail nous nous sommes proposé d'étudier l'influence de la lécithine et de la cholestérine à une concentration qui correspond à celle qu'on constate dans la bile de bœuf, sur la biologie du bacille tuberculeux, et de rechercher, s'il est possible, pourquoi la souche bovine de Calmette et Guérin, cultivée sur pomme de terre biliée, s'est transformée à la longue en souche BCG. Nous avons commencé ce travail avec une souche humaine et une souche bovine. Nous n'avons employé qu'une souche de chaque genre, car des difficultés de nature technique ne nous permettaient pas de multiplier les expériences. Malheureusement au cours des expériences, à cause d'un dérèglement de l'étuve, nous avons perdu la souche bovine. En conséquence, les résultats obtenus avec la souche humaine ne pourront qu'avec réserves être appliqués à la souche bovine que représente le BCG.

Comme milieu de base, nous avons choisi la pomme de terre + bouillon glyciné à 5 p. 100 au $pH = 7,2$. Pour établir l'influence supposée des lipoides, on ajouta ceux-ci au milieu-base, utilisant la méthode que nous avons déjà indiquée [29]. On a ajouté au premier groupe 0,1 p. 100 de lécithine; au second 0,07 p. 100 de cholestérine; au troisième 0,1 p. 100 de lécithine et 0,07 p. 100 de cholestérine; le quatrième groupe était la pomme de terre + bouillon glyciné à 5 p. 100, servant de témoin; le cinquième groupe était la pomme de terre biliée selon Calmette et Guérin. La proportion des lipoides ajoutés correspond à la concentration moyenne trouvée dans la bile de bœuf [41]. Pour simplifier, nous appellerons le milieu à la lécithine *milieu A*; le milieu à la cholestérine *milieu B*; le milieu à lécithine et à cholestérine *milieu C* (1); la pomme de terre

(1) J'ai employé de la lécithine Merck (*lécith. ex ovo puriss.*) et la cholestérine Kahlbaum; je fais remarquer que les résultats que j'ai obtenus ne peuvent valoir que si l'on emploie les mêmes préparations.

témoin D. La culture sur pomme de terre biliée a malheureusement péri avant que nous ayons pu examiner ses propriétés biologiques.

Sur les milieux ainsi préparés, on a ensemencé la souche humaine. Mais avant de décrire les expériences, il est utile d'indiquer l'origine et les caractéristiques de cette souche. Celle-ci, dite *Kr*, fut isolée selon la méthode biologique par le cobaye, d'un cas d'épanchement pleurétique mixte. Nous avons pu l'identifier comme étant du type humain. Avant d'être portée dans les milieux lipoides elle a passé 6 fois par pomme de terre + bouillon simple. Dans la suite nous désignerons par des chiffres romains les 6 générations afin d'éviter des erreurs avec les générations sur milieux-lipoides qui seront indiqués en chiffres arabes.

A la sixième génération, cette souche présentait les caractéristiques suivantes :

A l'examen *macroscopique* : sur pomme de terre + bouillon glyciné elle se développait lentement en donnant des colonies à peine visibles (1) après vingt-huit jours; après quarante-six jours elle donnait un voile abondant +++ et ne se développait pas sur le bouillon au fond du tube. Sur milieu à l'œuf, elle se développait mieux et donnait des colonies très apparentes en vingt jours.

Au microscope : la souche était composée de bacilles acido-résistants de longueur moyenne, réguliers, sans défauts de coloration, sans corpuscules polaires.

Virulence : 0 milligr. 1 d'émulsion bacillaire (2) [42] par injection intracardiaque tuait un cobaye de 250 grammes en moyenne dans le délai de trente jours; par injection intrapéritonéale la même dose tuait une souris blanche de 20 grammes en moyenne en treize jours. Tous les animaux succombaient avec des lésions tuberculeuses caractéristiques pour l'espèce donnée. Dans les préparations d'organes on a toujours constaté la présence de bacilles tuberculeux.

(1) + désigne des colonies bien définies, +++ un voile abondant.

(2) L'émulsion de bacilles fut faite selon la méthode de Calmette [42]. On employa pour la sixième génération une culture de trente jours; pour la vingt-cinquième génération une culture de vingt-cinq jours. Les bacilles furent pesés à l'état humide et avant de faire les prélèvements la culture était maintenue en position verticale pendant quarante-huit heures.

Après ces déterminations, la souche *Kr* futensemencée sur les milieux lipoides *A*, *B*, *C*, et sur le milieu témoin *D*; séjour à l'étuve à 37° C en position inclinée; réensemencements tous les vingt-cinq jours [42], ce que permettait la rapidité du développement.

II. — INFLUENCE DES LIPOIDES SUR LA RAPIDITÉ ET L'ABONDANCE DU DÉVELOPPEMENT DES BACILLES TUBERCULEUX.

Dès la première génération et d'une façon plus prononcée dans les générations suivantes, des différences remarquables se sont manifestées entre les différentes cultures. L'aspect macroscopique de celles-ci peut être ainsi précisé : la culture *témoin D* présentait l'aspect typique d'une culture de bacilles tuberculeux humains. La culture sur milieu à lécithine (*A*) et celle sur lécithine-cholestérine (*C*) poussaient sous forme de voile épais délicatement plissé, de couleur crème et, dans la troisième génération déjà, elles se développaient dans le bouillon au fond du tube. Le temps nécessaire pour obtenir une croissance +++ avec la sixième génération était en moyenne, pour la culture *témoin*, de quarante-six jours.

Avec la première génération	45 jours.
Avec la dixième génération	25 —
Avec la vingt-cinquième génération	9 —

Sur *milieu A*, le temps nécessaire pour obtenir une croissance +++ était :

Avec la première génération	30 jours.
Avec la dixième génération	20 —
Avec la vingt-cinquième génération	8 —

Sur *milieu B*, le temps nécessaire pour obtenir une croissance +++ était :

Avec la première génération	58 jours.
Avec la dixième génération	30 —
Avec la vingt-cinquième génération	17 —

Sur *milieu C*, le temps nécessaire pour obtenir une croissance +++ était :

Avec la première génération.	26 jours.
Avec la dixième génération	18 —
Avec la vingt-cinquième génération	5 —

Si l'on groupe les générations pour lesquelles, sur différents milieux, on a pu obtenir dans le même délai le même développement, on trouve que, sur *milieu témoin* on a obtenu à la dixième génération le même résultat que

Sur <i>milieu A</i>	Huitième génération.
Sur <i>milieu B</i>	Quatorzième génération.
Sur <i>milieu C</i>	Troisième génération.

La rapidité du développement s'accroissait proportionnellement au nombre des générations sur chaque milieu, indépendamment du caractère de ce milieu. Il s'ensuit que, seules la fréquence des réensemencements et l'accoutumance au milieu exercent une influence favorable sur la rapidité et sur l'abondance du développement. Rappelons-nous que le temps nécessaire pour obtenir le développement +++ à la sixième génération était de quarante-six jours, et comparons-le avec les données obtenues sur différents milieux à la vingt-cinquième génération : nous verrons que le rapport entre la rapidité de croissance à la sixième génération et la rapidité de croissance à la vingt-cinquième est, pour la culture *témoin*, de 5,44 ; pour la culture *A* de 5,75 ; pour la culture *C* de 9,20 ; pour la culture *B* de 2,70. Cette *accélération totale du développement*, ainsi que nous croyons devoir la désigner, est obtenue aussi bien par l'action des réensemencements fréquents et des conditions eugénétiques en général, que par l'influence spécifique des substances lipoïdes. La rapidité du développement a subi une accélération sur tous les milieux, mais une accélération inégale. Celle-ci s'est manifestée au plus haut degré dans la culture *C* ; à un moindre degré dans la culture *A* ; à un degré moyen dans la culture *D*, et au plus faible degré dans la culture *B*. Par contre, l'accélération qui se manifeste dans la culture *témoin D*, déterminée par la fréquence des réensemencements, par l'accoutumance au milieu et par les conditions eugénétiques (sans influence des lipoïdes), peut être appelée *accélération absolue ou non spécifique du développement*. Elle est égale à l'accélération totale pour *D*. On obtient le coefficient de l'accélération spécifique due aux lipoïdes en comparant la

rapidité du développement sur *milieux lipoides* avec celle qui est observée sur *milieu témoin*. Comme le temps nécessaire, à la vingt-cinquième génération, pour obtenir une croissance +++ sur *milieu témoin* est de neuf jours, sur milieu *A* de huit jours, sur milieu *C* de cinq jours, sur milieu *B* de dix-sept jours, l'accélération spécifique ou relative à la vingt-cinquième génération est pour *A* de 1,12, pour *C* de 1,80, pour *B* de 0,83, et pour *D*, naturellement, elle est égale à l'unité. Cela veut dire que, pour l'accélération spécifique, nous obtenons la plus grande valeur pour la culture *C*; une moindre valeur pour la culture *A*, et que, pour *B*, nous obtenons une valeur plus petite que l'unité. Autrement dit, la combinaison de lécithine et de cholestérine agit le plus favorablement sur le développement des bacilles tuberculeux. La lécithine seule a une action bien inférieure et la cholestérine seule exerce une action empêchante sur le développement des bacilles tuberculeux.

Dans la première génération le temps nécessaire pour obtenir +++ sur *milieu témoin* était de quarante-cinq jours :

Sur <i>milieu A</i>	30 jours.
Sur <i>milieu C</i>	26 —
Sur <i>milieu B</i>	52 —

L'accélération relative ou spécifique était :

Pour <i>A</i>	1,50
Pour <i>B</i>	0,76
Pour <i>C</i>	1,73

L'accélération spécifique s'est accrue pour le milieu optimum *C* et a diminué pour le milieu le plus mauvais *B*. En soustrayant les chiffres qui expriment le nombre de jours nécessaires pour obtenir +++ sur milieux lipoides, des chiffres analogues pour le milieu témoin, nous obtenons des données qui caractérisent l'accélération spécifique (relativement au ralentissement) du développement exprimée en jours.

A la vingt-cinquième génération ces données se présentent de la manière suivante :

Pour <i>A</i> on obtient	+ 1
Pour <i>B</i> on obtient.	— 8
Pour <i>C</i> on obtient.	+ 4
Pour <i>D</i> on obtient	0

L'activité de la croissance sur les différents milieux se présente comme suit : la culture sur milieu *C* se développait avec la plus grande activité. En prenant de strictes précautions pour prélever toujours la même quantité de semence avec la même spatule en platine, avec le même *pH* elle donnait une quantité deux fois plus grande de bacilles (en poids) que la culture témoin *D*. Sur milieu *A* la différence était nette, mais moins grande que sur milieu *C*. Enfin sur milieu *B*, on a observé une diminution manifeste de la quantité de bacilles en comparaison avec le milieu témoin.

Une certaine différence existait constamment entre les résultats obtenus par Nyren (1) et les nôtres. Nyren cultivait des bacilles acido-résistants pathogènes et saprophytes sur gélose avec et sans peptone et avec des solutions de lipoides préparées selon la méthode indiquée par Much. Les bacilles pathogènes se trouvaient sur un milieu où, en principe, ils ne se développaient pas, et effectivement les tubes témoins restaient toujours stériles. Nyren a remarqué que l'addition de 0,1 p. 100 de lécithine permet aux bacilles pathogènes la croissance sur gélose, alors que sans cette addition ils ne se seraient pas développés. Cependant, selon Nyren, le mélange de lécithine et de cholestérine, et encore moins la cholestérine seule, ne manifestait pas cette influence. En se servant comme milieu-base d'un milieu sur lequel les bacilles tuberculeux ne se développaient pas, Nyren n'a pas pu répondre avec certitude à la question de savoir si la cholestérine exerce une influence empêchante sur le développement des bacilles tuberculeux ou si elle se borne à ne pas stimuler le développement des bacilles tuberculeux. Il ne pouvait que conclure par approximation que la cholestérine empêchait le développement. Mais, par les tableaux donnés par Nyren, on se trouve en face d'un fait très intéressant. Les bacilles acido-résistants saprophytes, qui se développent abondamment sur milieu-base (gélose), se développent bien sur milieu-lécithine; sur cholestérine le développement est empêché; sur cholestérine-lécithine ils se développaient abondamment, aussi abondamment que sur la lécithine

(1) J'ai commencé ce travail en 1927, c'est-à-dire deux ans avant que le travail de Nyren fût publié. Je n'ai pris connaissance de ce dernier qu'en 1931.

seule, et même un plus grand nombre de souches donnaient un développement plus abondant sur cholestérine-lécithine que sur la lécithine seule. Nos propres cultures de bacilles pathogènes se trouvaient dans des conditions qui ne peuvent aucunement être comparées aux conditions dans lesquelles opérait Nyren, puisque, comme milieu-base, nous avons employé la pomme de terre + bouillon glycérimé, c'est-à-dire un milieu sur lequel les bacilles sans aucune addition se développent très bien. Dans ces conditions, nous avons observé la stimulation de croissance optima avec la cholestérine-lécithine, et nous sommes en mesure de répondre à la question de savoir si la cholestérine exerce réellement une action empêchant la croissance des bacilles, ou si c'est l'action stimulante qui lui manque. Car en comparant le degré de développement sur milieu *B* avec le milieu témoin, nous avons pu démontrer, comme nous l'avons déjà vu plus haut, une diminution notable dans la rapidité et l'abondance du développement, diminution causée par l'addition de cholestérine. Nous croyons que, outre la technique différente adoptée pour la préparation de la solution de lipéide et la différence de concentration de la cholestérine (Nyren employait 0,1 p. 100 de cholestérine), la différence mentionnée plus haut du milieu suffit entièrement pour expliquer la différence des résultats obtenus par Nyren et par nous. L'action des lipéides sur les bacilles tuberculeux dépend, suivant nous :

1° De la concentration des lipéides.

2° Du milieu sur lequel ils exercent leur action, c'est-à-dire des autres substances nécessaires à la croissance des bacilles, qui se trouvent dans le milieu ;

3° Sans doute aussi des diverses souches.

Dans le cas présent le milieu de Nyren pouvait être la raison pour laquelle la lécithine-cholestérine n'a pas pu manifester la même action que dans le milieu sur pomme de terre, bouillon et glycérine. Il est possible que l'action de la lécithine et de la cholestérine que nous tâcherons d'analyser ci-après puisse se manifester seulement en présence de certaines substances et dans un certain milieu, alors que, dans le milieu de Nyren, l'effet empêchant de la cholestérine pouvait seul se manifester. La lécithine, dans l'expérience de Nyren, exerçait une action

stimulante du développement des bacilles tuberculeux avec tant de force que la croissance s'effectuait, même lorsque la glycérine faisait défaut, sur un milieu impropre au développement des bacilles tuberculeux. Le mélange de lécithine et de cholestérine n'avait plus cette influence, ce qui ne signifie pas qu'il ne pourrait dans un autre système, tel que celui que représente notre milieu, développer une action tout à fait opposée.

Pour connaître l'influence des lipoides sur la croissance des bacilles tuberculeux, nous avons étudié, outre la souche *Kr.*, 8 souches humaines et 8 souches bovines. Toutes se comportaient comme la souche *Kr.*, sauf que peut-être l'influence de la lécithine et de lécithine-cholestérine sur les bacilles bovins était encore plus marquée que sur les bacilles humains. Mais la limitation de notre matériel et de nos expériences à l'emploi du seul milieu pomme de terre + bouillon glycérimé comme base et à une proportion des lipoides, toujours la même, ne nous permet pas de tirer des conclusions de portée générale; et ceci d'autant plus que, comme les expériences de Much relatives à l'influence de lipoides sur la croissance des plantes nous l'ont montré, cette influence dépend d'une foule d'agents secondaires (43-46). Non seulement l'espèce de la plante mais aussi son âge changent complètement sa sensibilité envers l'action des lipoides, c'est-à-dire qu'une plante de deux ans réagit autrement à l'action des lipoides qu'une plante d'un an.

Le fait, qui nous paraît paradoxal au premier coup d'œil, que la lécithine-cholestérine stimule plus fortement le développement du bacille tuberculeux que la lécithine seule, tandis que la cholestérine seule a une action empêchant le développement, suggère quelques hypothèses qui pourraient expliquer théoriquement ce phénomène :

1° Il se peut que la présence de lécithine permette à la cholestérine d'exercer une action stimulante, tandis que la cholestérine seule ne peut pas le faire;

2° Il se peut que la cholestérine confère à la lécithine des effets stimulants plus puissants que n'en peut exercer la lécithine seule;

3° Il est possible que la lécithine permette aux bacilles tuberculeux d'utiliser pour leur métabolisme la cholestérine

qui, sans la présence de lécithine, ne peut être attaquée et qui empêche alors la croissance. On rencontre assez souvent dans la nature des phénomènes où deux substances antagonistes, dans certaines conditions, deviennent synergiques. Nous avons l'impression que ces deux énigmes, à savoir pourquoi la lécithine-cholestérine ajoutée à la gélose ne stimule pas la croissance, alors que, dans le système pomme de terre + bouillon glyciné, le même mélange de cholestérine et de lécithine stimule plus fortement que la lécithine seule, s'expliquent parce que l'action des lipoides est à un certain degré *amphotère*.

III

L'étude de la morphologie des bacilles tuberculeux cultivés sur milieu lipoides sera le sujet d'une autre publication. Nous désirons seulement faire ici quelques remarques. Les bacilles cultivés sur nos quatre types de milieux, et aussi sur milieu témoin, étaient en général fortement acido-résistants, normaux, un peu plus grands qu'à la sixième génération. Presque tous contiennent des corpuscules acido-résistants, fuchsinophiles, à localisation polaire ou quelquefois centrale. Dans la culture *C* on a trouvé le plus grand nombre de ces corpuscules; dans la culture *A* un peu moins, puis dans la culture *D*, et c'est enfin dans la culture *B*, qu'on en a trouvé le moins.

IV. — INFLUENCE DES LIPOIDES SUR LA VIRULENCE DES BACILLES TUBERCULEUX.

Après 25 générations sur milieu-lipoides, nous avons étudié la virulence de toutes les cultures filles de la souche *Kr*. Dans la préparation des émulsions dans les pesées, dans le choix des animaux en ce qui concerne leur poids, leur âge, leur alimentation, etc., nous avons pris les plus grandes précautions pour nous placer dans des conditions tout à fait identiques à celles qui s'offraient à nous lors de l'étude de la virulence de notre sixième génération.

Pour déterminer les modifications éventuelles de virulence, nous nous sommes basés sur le travail de Calmette, Boquet et Nègre [47] et nous avons opéré sur 65 cobayes et 45 souris

blanches. D'autres expériences sont encore en cours. Si, malgré un matériel relativement restreint, nous nous sommes décidé à publier nos résultats, c'est parce qu'ils se sont présentés avec une étonnante régularité et une exactitude mathématique, de sorte que nous ne pouvons pas admettre que nous nous sommes trouvé en présence de phénomènes accidentels. Lorsqu'on inocule par voie intracardiaque les cobayes, la virulence des cultures prises isolément se présente ainsi à la vingt-cinquième génération :

0 milligr. 1 de culture *A* tuait un cobaye de 250 grammes en moyenne en trente-quatre jours.

0 milligr. 1 de culture *B* tuait un cobaye de 250 grammes en moyenne en vingt-deux jours.

0 milligr. 1 de culture *C* tuait un cobaye de 250 grammes en moyenne en dix-sept jours.

0 milligr. 1 de culture *D* tuait un cobaye de 250 grammes en moyenne en vingt-sept jours.

La culture *C* s'est montrée la plus virulente ; la culture *A* la moins virulente. Ainsi, par ce mode d'inoculation intracardiaque aucune culture n'a manifesté d'atténuation de virulence en comparaison avec la virulence de la sixième génération ou bien elle en a manifesté une très minime. Nous croyons qu'on peut expliquer ce fait parce que la dose de 0 milligr. 1 injectée dans le cœur est énorme ; elle dépasse infiniment la dose mortelle, de sorte que, même si les cultures avaient notablement baissé de virulence, on n'aurait pas pu s'en apercevoir. C'est pourquoi dans les expériences suivantes nous avons abandonné cette méthode.

Lorsqu'on fait l'inoculation par voie intrapéritonéale, la virulence des cultures prises isolément se présente ainsi :

0 milligr. 1 de culture *A* tuait un cobaye de 250 grammes en moyenne en soixante-seize jours.

0 milligr. 1 de culture *B* tuait un cobaye de 250 grammes en moyenne en cinquante-deux jours.

0 milligr. 1 de culture *C* tuait un cobaye de 250 grammes en moyenne en quarante-trois jours.

0 milligr. 1 de culture *D* tuait un cobaye de 250 grammes en moyenne en cinquante-neuf jours.

Pour préciser les différences entre les cultures *A* et *B* on a fait les inoculations suivantes (intrapéritonéales) :

0 milligr. 01 de culture *A* tuait un cobaye de 250 grammes en moyenne en quatre-vingt-dix-sept jours.

0 milligr. 01 de culture *B* tuait un cobaye de 250 grammes en moyenne en quatre-vingts jours.

En pratiquant l'inoculation par voie sous-cutanée, la virulence de la culture *A* et *B*, à la vingt-cinquième génération, se présentait comme suit :

0 milligr. 1 de culture *A* tuait un cobaye de 250 grammes en moyenne en cent six jours.

0 milligr. 1 de culture *B* tuait un cobaye de 250 grammes en moyenne en cinquante-trois jours.

Les autres cultures n'ont pas encore été inoculées par voie sous-cutanée.

L'étude de la virulence des cultures, prises isolément, pour la souris blanche, a donné à la vingt-cinquième génération les résultats suivants (inoculation intrapéritonéale) :

1 milligramme de culture *A* tuait une souris de 20 grammes en moyenne en cent deux jours.

1 milligramme de culture *B* tuait une souris de 20 grammes en moyenne en vingt-deux jours.

1 milligramme de culture *C* tuait une souris de 20 grammes en moyenne en quatre-vingt-seize jours.

1 milligramme de culture *D* tuait une souris de 20 grammes en moyenne en quarante-huit jours.

Tous les animaux ont succombé avec des lésions caractéristiques de tuberculose pour l'espèce donnée.

Pour les cobayes inoculés par voie intrapéritonéale les lésions macroscopiques spécifiques ont été constatées :

Dans le poumon, l'épiploon, les ganglions mésentériques.	100 p. 100
Sur le péritoine et dans les ganglions inguinaux . . .	80 —
Dans la rate et les ganglions rétrosternaux	70 —
Dans le foie	40 —

Des lésions macroscopiques non spécifiques ont été constatées :

Hypertrophie et fragilité de la rate.	100 p. 100
Hypertrophie et dégénérescence graisseuse du foie .	90 —
Ascite, congestion de la substance médullaire et hypertrophie de la substance corticale des capsules surrénales (48)	70 —
Congestion et œdème des reins	50 —

Examen microscopique : Pour 100 p. 100 d'organes présentant des lésions macroscopiques spécifiques on a constaté la présence de bacilles tuberculeux. Dans les organes apparemment sains, ne présentant à l'examen macroscopique aucune lésion spécifique, on a trouvé des bacilles tuberculeux :

Dans la rate	100 p. 100
Dans les ganglions lymphatiques.	50 —
Dans les reins	40 —
Dans le foie	25 —
Dans les capsules surrénales.	10 —

A l'autopsie des souris blanches des lésions macroscopiques spécifiques ont été trouvées :

Dans l'épiploon et sur le péritoine	100 p. 100
Dans le poumon	20 —
Dans la rate et le foie	10 —
Dans les reins, les capsules surrénales et les ganglions lymphatiques	5 —

On a toujours constaté les lésions macroscopiques non spécifiques suivantes : congestion et hypertrophie de la rate, hypertrophie du foie. Les autres souris ont fait une tuberculose du type Yersin. On trouvait des bacilles chez 100 p. 100 dans le poumon, la rate, le foie, les reins, les capsules surrénales, l'épiploon, le péritoine et les ganglions lymphatiques.

RÉSULTATS.

En principe, si nous mettons à part les résultats des inoculations intracardiaques qui ne pouvaient rien nous apprendre, nous voyons que toutes les cultures *A*, *B*, *C*, *D*, ont perdu une importante partie de leur virulence. Pour le cobaye, la culture *A* s'est montrée la moins virulente alors que la culture *C* était la plus active. Pour les souris la culture *A* s'est également montrée la moins virulente, tandis que la culture *B* l'était le plus. En comparant les délais après lesquels succombaient les cobayes de même poids et de même âge inoculés avec la culture-mère de la sixième génération, avec les délais après lesquels ils ont succombé après avoir été inoculés avec les cultures *A*, *B*, *C*, *D* de la vingt-cinquième génération, nous pou-

vons établir un coefficient de l'atténuation totale de la virulence. Ce coefficient nous donne une idée de la perte de la virulence due aussi bien à l'action des conditions eugénétiques qu'à l'action spécifique des lipoides. Les cobayes inoculés par voie intrapéritonéale avec la culture-mère de la sixième génération succombaient en moyenne en trente-cinq jours. Ceux inoculés avec les cultures :

<i>A</i> ont succombé après.	76 jours.
<i>B</i> ont succombé après.	52 —
<i>C</i> ont succombé après.	43 —
<i>D</i> ont succombé après.	59 —

Le coefficient de l'atténuation totale de virulence à la vingt-cinquième génération, lorsqu'on pratique l'inoculation par voie intrapéritonéale, est :

Pour <i>A</i>	$76 : 35 = 2,17$
Pour <i>B</i>	$52 : 35 = 1,48$
Pour <i>C</i>	$43 : 35 = 1,20$
Pour <i>D</i>	$59 : 35 = 1,68$

Le coefficient de l'atténuation totale de virulence des différentes cultures, calculé de la même façon pour la souris (avec la vingt-cinquième génération), est (inoculation intrapéritonéale) :

Pour <i>A</i>	9,07
Pour <i>B</i>	1,69
Pour <i>C</i>	7,33
Pour <i>D</i>	3,69

L'atténuation de virulence qui se manifeste dans la culture témoin *D* peut être appelée *atténuation absolue, ou non spécifique*, et son coefficient, *coefficient absolu ou non spécifique*, de la perte de virulence. Cette atténuation est due à des conditions eugénétiques générales : fréquence des réensemencements, etc., mais non à l'action des lipoides. Le coefficient absolu de la perte de virulence est égal au coefficient total pour la culture témoin *D*, c'est-à-dire qu'il est, pour les cobayes, de 1,68 ; pour les souris de 3,69 (après inoculation intrapéritonéale).

En comparant l'atténuation de virulence des cultures sur milieux-lipoides avec l'atténuation de virulence de la culture témoin (à la vingt-cinquième génération), nous arrivons à la

conception d'un *coefficient relatif* ou *spécifique de la perte de virulence*. Le chiffre obtenu par la division du nombre des jours qui s'écoulèrent entre l'inoculation et la mort des animaux inoculés avec les cultures lipoides, par le nombre des jours qui s'écoulèrent entre l'inoculation et la mort des animaux inoculés avec la culture témoin, nous indique dans quels cas l'addition des lipoides (en comparaison avec la culture-témoin) a atténué ou augmenté la virulence des bacilles.

En pratiquant l'inoculation intrapéritonéale des cobayes, le coefficient relatif ou spécifique se présente comme suit :

Pour A	76 : 59 = 1,28
Pour B	52 : 59 = 0,88
Pour C	43 : 59 = 0,72
Pour D	59 : 59 = 1,00

Nous voyons que le coefficient spécifique est plus grand que l'unité seulement pour A, c'est-à-dire pour la lécithine. Il en résulte que, seulement la lécithine, en comparaison avec la culture témoin, a atténué la virulence des bacilles tuberculeux pour les cobayes.

Le coefficient relatif ou spécifique calculé de la même façon pour les souris blanches se présente comme suit :

Pour A	102 : 48 = 2,12
Pour B	22 : 48 = 0,45
Pour C	96 : 48 = 2,00
Pour D	48 : 48 = 1,00

Nous voyons donc que le coefficient spécifique pour les souris est plus grand que l'unité pour les cultures A et C et plus petit que l'unité pour la culture B.

En soustrayant le chiffre qui indique la durée de la vie des animaux inoculés avec la culture témoin D des chiffres analogues se rapportant aux animaux inoculés avec les cultures lipoides, nous obtenons des données qui expriment (relativement à l'augmentation) l'atténuation spécifique de la virulence en nombre de jours. Ces données, pour la vingt-cinquième génération, lorsqu'on fait l'inoculation intrapéritonéale, se présentent ainsi :

Pour le *cobaye* on obtient :

Pour <i>A</i>	+ 17
Pour <i>B</i>	— 7
Pour <i>C</i>	— 16
Pour <i>D</i>	0

Pour les *souris* :

Pour <i>A</i>	+ 54
Pour <i>B</i>	— 22
Pour <i>C</i>	+ 48
Pour <i>D</i>	0

A ces résultats on pourrait objecter qu'en inoculant des cobayes avec des bacilles tuberculeux, indépendamment de la virulence de ces derniers, on rencontre très fréquemment des différences individuelles de susceptibilité et d'immunité qui se manifestent par la durée plus ou moins longue de la maladie à partir du jour de l'inoculation jusqu'au jour de la mort. A cette objection nous répondrons qu'on rencontre, il est vrai, de telles oscillations, mais qu'en principe, selon notre expérience, elles ne s'observent que chez les animaux inoculés par voie sous-cutanée. Pour répondre à l'objection que les inoculations ont pu être effectuées avec une technique peu précise et qu'alors certains animaux ont pu recevoir des quantités inégales de bacilles, nous devons décrire les précautions observées au cours des inoculations. Nous avons employé une seringue calibrée en centièmes de centimètre cube et l'émulsion des bacilles était très diluée, de telle sorte qu'un défaut éventuel de précision dans le dosage de l'émulsion calculé en bacilles ferait une différence vraiment minime. En observant de strictes précautions et en pratiquant l'inoculation intrapéritonéale chez des animaux de même âge, de mêmes poids et sexe (pour la plupart des mâles) et si possible de la même nichée, nous n'avons jamais trouvé de différences notables entre le temps de survie des animaux inoculés avec la même culture. Nous n'avons non plus jamais remarqué de complications dues à l'inoculation intrapéritonéale (adhérences, etc.), qui auraient hâté la mort. S'il y avait parfois quelque différence, le temps le plus court après lequel succombait un animal inoculé avec la culture *A* n'était jamais même approché du temps de survie des animaux inoculés avec la culture *B*. Au contraire, le plus fréquemment les animaux inoculés avec la même culture suc-

combaient le même jour ou à des intervalles d'un jour. Nous avons noté des différences entre les séries d'inoculations pratiquées en hiver et celles qui furent pratiquées en été. Les animaux des séries d'été, bien que nourris d'herbe et d'avoine verte, de pois verts et de choux, succombaient dans un délai plus court que les animaux des séries d'hiver nourris de betteraves fourragères et d'avoine, naturellement toute proportion gardée entre les animaux inoculés avec les cultures *A*, *B*, *C* et *D*.

V. — CONCLUSIONS.

En principe toutes nos cultures sur les divers milieux ont perdu une partie de leur virulence, mais pas au même degré. Pour les cobayes et les souris, la culture *A* a perdu le plus de virulence. La culture *C* en a perdu le moins pour les cobayes; la culture *B* pour les souris. Entre les causes qui ont occasionné l'atténuation de la virulence de toutes nos cultures et spécialement de quelques-unes d'entre elles, il faut distinguer les causes *spécifiques* et les causes *non spécifiques*. Parmi les causes non spécifiques, il faut classer les conditions eugénétiques générales dans lesquelles se trouvaient les cultures, savoir :

- I. *a*) La fréquence des réensemencements (49);
- b*) La température optima constante;
- c*) Le pH favorable au développement du bacille tuberculeux ($\approx 7,2$);
- d*) L'accoutumance au milieu;
- e*) L'influence non spécifique de la lécithine stimulant le développement et créant ainsi indirectement des conditions eugénétiques;
- f*) L'influence non spécifique de la cholestérine qui empêche le développement et qui crée ainsi des conditions dysgénétiques.

Parmi les causes spécifiques nous considérons :

- II. *a*) L'influence spécifique de la lécithine atténuant la virulence;
- b*) L'influence spécifique de la cholestérine augmentant la virulence.

Nous allons prendre l'une après l'autre les causes pour lesquelles, comme nous le supposons, les cultures prises isolément ont baissé (ou augmenté) de virulence.

Les raisons pour lesquelles la culture *A* a perdu le maximum de sa virulence sont probablement les suivantes : le groupe entier des facteurs non spécifiques (sauf l'action de la cholestérine) et l'influence spécifique de la lécithine atténuant la virulence (I. *a, b, c, d, e* et II. *a*).

Le fait que la culture *B* a perdu beaucoup moins de virulence est probablement dû à divers facteurs : parmi les facteurs non spécifiques, le facteur I. *e* fait défaut, c'est-à-dire que l'influence de la lécithine qui stimule le développement manque. A sa place se présente l'influence non spécifique de la cholestérine qui empêche le développement des bacilles. Parmi les facteurs spécifiques, l'influence de la lécithine (II. *a*) manque et à sa place se présente l'influence de la cholestérine qui augmente la virulence des bacilles tuberculeux.

Pour la culture témoin *D*, les causes de la perte de virulence, autant qu'on peut en juger, sont : I. *a, b, c, d*.

Pourquoi la culture *C* s'est-elle montrée pour les cobayes plus virulente encore que la culture *B*, tandis que, pour les souris, la culture *B* est très virulente et que *C* l'est beaucoup moins? Il n'est pas facile de répondre exactement à cette question. Nous voyons, en ce qui concerne le développement, que la combinaison de deux lipoides donne un résultat qui n'est pas l'effet de la compensation des facteurs antagonistes, et qui n'est exercé par aucun des deux éléments. De même, la combinaison des deux lipoides produit une culture dont la virulence s'est montrée, pour une espèce déterminée d'animaux, la plus élevée de toutes. Il faut accepter que diverses cultures de bacilles sont de virulence maxima pour diverses espèces d'animaux, et que, dans un type comme le bacille tuberculeux humain, on peut artificiellement obtenir des types qui diffèrent beaucoup au point de la virulence. Il faut aussi conclure que l'atténuation de la virulence pour une espèce ne signifie point l'atténuation de la virulence en général, mais seulement l'atténuation de la virulence pour l'espèce donnée. Il est intéressant de savoir qu'un changement apparemment aussi insignifiant que l'addition de 0,4 p. 100 de lécithine au milieu *B* fait qu'au lieu de la culture *B*, très virulente pour les souris et relativement peu virulente pour les cobayes, on obtient une culture *C*, très virulente pour le cobaye et très peu virulente pour la souris. Il

faut, enfin, remarquer que l'influence de la cholestérine est si forte qu'elle supprime l'influence des conditions eugénétiques. Répétons que les résultats que nous avons obtenus ne valent que pour la souche que nous avons employée, pour les espèces animales avec lesquelles on a pratiqué les expériences et pour la proportion indiquée des lipoides. Ces résultats ne permettent pas d'en déduire des lois générales concernant l'action de la lécithine et de la cholestérine sur la virulence et sur le développement du bacille tuberculeux, si ce n'est avec beaucoup de réserve. Indépendamment des effets de la combinaison des lipoides qui, en ce qui concerne le développement et la virulence, peut être plus intense que l'action de chaque lipuide pris isolément, nous trouvons un antagonisme net, au point de vue de la virulence, aussi bien pour le cobaye que pour la souris. Nous pensons que, dans cette influence des lipoides, il faut distinguer en principe, comme nous l'avons déjà remarqué plus haut, deux modes d'action sur le développement et sur la virulence du bacille tuberculeux :

1° L'influence de la lécithine qui stimule le développement et de la cholestérine qui l'empêche;

2° L'influence de la lécithine qui affaiblit la virulence des bacilles et de la cholestérine qui l'augmente.

Ces influences peuvent s'exercer simultanément ou séparément. C'est ainsi que :

La cholestérine empêche le développement;

La lécithine-cholestérine stimule le développement plus fortement que la lécithine seule;

La lécithine produit une atténuation de virulence;

La lécithine-cholestérine favorise la virulence pour le cobaye et pour les souris plus que la lécithine seule. Pour ce qui concerne le développement, nous voyons que l'influence de la lécithine se montre plus forte, et pour ce qui est de la virulence l'influence de la cholestérine est plus forte. L'influence sur le développement est donc distincte de l'influence sur la virulence. Nous voyons de plus que, quant au développement, la lécithine et la cholestérine sont antagonistes, mais que leur mélange produit un accroissement de l'influence de la lécithine. Quant à la virulence leur mélange produit un accroissement de l'influence de la cholestérine (pour le cobaye). Il faut

probablement ranger les antagonismes mentionnés ci-dessus de la lécithine et de la cholestérine à côté de leur influence antagoniste sur les processus de la phagocytose, de la coagulation du sang, de la zoo- bactério- et hémolyse et de la sédimentation des hématies. Ces antagonismes sont basés pour la plupart sur des processus physico-chimiques (59).

L'idée que les bacilles qui se trouvent dans des conditions eugénétiques perdent leur virulence n'est pas neuve et on la rencontre assez souvent dans la littérature. Cette idée se base sur les observations faites à propos de l'augmentation de la virulence des microbes par passages à travers l'organisme des animaux, c'est-à-dire dans des conditions dysgénétiques, et aussi sur la théorie *a priori* que la virulence des bacilles est un fait acquis dans la lutte pour la vie. Quelques espèces de microbes perdent en partie ou entièrement leur virulence sur les milieux artificiels. Un exemple classique en est le microbe de la péripneumonie des bovidés, avec les cultures duquel il est impossible, après quelques générations, d'infecter un animal. En ce qui concerne notre souche *Kr.*, nous avons constaté que l'intensité du développement, qui résulte des conditions eugénétiques, ne va pas de pair avec l'atténuation de la virulence (exemple la culture *C*).

De quelle nature peut être l'influence de la lécithine et de la cholestérine sur les bacilles tuberculeux? Nyren suppose que l'assimilation du phosphore contenu dans la lécithine, et qui est nécessaire à la synthèse du corps bacillaire, y joue un rôle. Cela pourrait peut-être nous expliquer l'intensité du développement. Mais pour ce qui est de l'atténuation de la virulence, l'hypothèse suivante se présente. En employant la lécithine en fortes proportions, jusqu'à 10 p. 100, on a obtenu dans un délai très court de brusques changements accompagnés d'une altération des bacilles telle que la bactériolyse, la perte de l'acido-résistance, qui affaiblissait ou détruisait même la virulence lorsque les bacilles restaient vivants. Avec des proportions très faibles de lécithine, comme celles que nous avons utilisées dans nos expériences, nous n'avons jamais observé de bactériolyse, ni de perte d'acido-résistance. Mais la somme des influences de la lécithine en faible proportion au cours des générations successives peut conduire à une atténuation de virulence sans endom-

mager les propriétés morphologiques des bacilles. C'est un phénomène analogue qui se produit dans les faits signalés par Arima, Aoyoma et Ohnawa [51]. Ces auteurs, en ajoutant à leurs cultures de la saponine et de la lipase, agents puissamment bactériolytiques, ont obtenu par réensemencements successifs une souche non virulente, et qui a même perdu l'acidorésistance.

Il est encore plus difficile d'édifier une hypothèse susceptible d'expliquer l'influence de la cholestérine. Il se pourrait que celle-ci soit un élément indispensable à la synthèse du bacille virulent, ou de ses produits, ou bien qu'elle joue dans ce processus un rôle intermédiaire. Il se pourrait qu'elle crée des conditions dysgénétiques, grâce auxquelles se produirait l'augmentation de la virulence.

Il est probable que les modifications physico-chimiques qu'entraîne l'addition de lipoïdes au milieu de culture jouent aussi un rôle important dans les phénomènes ci-dessus décrits. On sait, en effet, que la lécithine et la cholestérine sont antagonistes. La lécithine diminue la tension superficielle, la cholestérine l'augmente selon les uns, ne la change pas selon les autres. La lécithine augmente la perméabilité des membranes composées de lipoïdes; la cholestérine la diminue [58]. La lécithine élève le coefficient de solubilité des graisses dans l'eau, la cholestérine augmente la solubilité de l'eau dans les graisses. Le mélange de ces deux corps montre que l'action de la cholestérine reste toujours plus intense que celle de chacun des deux éléments isolés [59]. Ces faits, ainsi que beaucoup d'autres que nous ne mentionnerons pas ici, doivent avoir une influence puissante sur la biologie du bacille tuberculeux, sur son développement et sur sa virulence.

Enfin, nous ne devons pas méconnaître que, comme beaucoup d'autres souches, la souche Kr. peut avoir une tendance naturelle à perdre graduellement de sa virulence, surtout lorsqu'elle est cultivée sur pomme de terre [57]. Mais il ne s'agit là que d'un affaissement progressif, qui se produit au même degré sur la culture témoin; c'est l'atténuation que nous avons appelée *absolue* ou *non spécifique*.

Quant à tirer des conclusions relatives aux causes qui ont réalisé la perte de virulence de la souche BCG, les idées fonda-

mentales de Calmette [50] relatives à l'influence des lipoides et du pH favorable restent intactes. Nous voudrions simplement y ajouter celle des réensemencements fréquents [49], et indiquer que, selon nous, l'action des lipoides se rapporte seulement à celle de la lécithine, car il résulte de nos expériences que, dans le mélange de lécithine et de cholestérine, en concentration correspondant à celle qui existe dans la bile de bœuf, la lécithine affaibit la virulence des bacilles tuberculeux aussi bien pour le cobaye que pour la souris.

Toutefois, comme il a déjà été dit, nous ne sommes pas autorisé à affirmer que les faits se passent exactement de la même manière avec la souche bovine *BCG* qu'avec la souche humaine que nous avons étudiée.

Peut-être que, dans la bile de bœuf, outre la lécithine, existent d'autres agents encore plus efficaces capables d'atténuer plus activement encore la virulence des bacilles tuberculeux, ou que la même combinaison de lipoides réalisée dans la bile exerce une action différente de celle que nous avons observée dans notre milieu. Pour mieux élucider ces faits, il faudra examiner la virulence des cultures *A*, *B*, *C*, *D*, dans les générations subséquentes avec les mêmes méthodes et avec la richesse en matériel animal que Calmette a pu utiliser [53-56]. Il faudra aussi étudier la faculté de production de la tuberculine de ces cultures.

Tout au moins pour le moment, nous ne pouvons pas fournir d'explication ou d'interprétation plus complète et définitive des résultats que nous avons obtenus. Ce qui précède n'est qu'un prélude à un travail beaucoup plus étendu. Mais les faits que nous avons observés montrent au moins quel rôle considérable jouent les lipoides dans la biologie du bacille tuberculeux.

M. le Professeur M. Gieszczykiewicz m'a encouragé à tâcher de rechercher par quel mécanisme la souche *BCG* a perdu sa virulence. Je voudrais ici lui exprimer toute ma gratitude.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] GORIS. *Ces Annales*, 18, 1920.
- [2] MALM. *Zentralbl. f. Bakt.* I, O, 70, 1913.
- [3] (r) WARNECKE. *Zeitschrift f. Tbk.*, 56, 1930.

- [4] (r) EISLER et LAUB. *Wiener klin. Wchft.*, 1913.
- [5] (r) OTOLSKI et BIERNACKI. *Biochem. Ztschft.*, 1912.
- [6] (r) WHITE et GAMMON. *Journ. of med. Res.*, 1912.
- [7] DEYCKE et MUCH. *M. med. Wchft.*, 1909.
- [8] (r) CALCATERRA. *An. Inst. Maragl.*, 1912.
- [9] ISABOLINSKY et GITOWITSCH. *Z. f. Immun. u. Exp. Pat.*, 54, 1927.
- [10] ISABOLINSKY et GITOWITSCH. *Z. f. Immun. u. Exp. Pat.*, 40, 1924.
- [11] ISABOLINSKY et GITOWITSCH. *Z. f. u. Immun. u. Exp. Pat.*, 41, 1924.
- [12] ISABOLINSKY et GITOWITSCH. *Z. f. Immun. u. Exp. Pat.*, 51, 1927.
- [13] BEYER. *Zbl. f. Bakt.*, I, O, 56, 1910.
- [14] ZEUNER. *Zbl. f. Bakt.*, I, O, 54, 1910.
- [15] (r) PLATONOFF. *Revue de la Tuberculose*, 1928.
- [16] (r) CALMETTE, MASSOL, BRETON. *C. R. Acad. Sc.*, 1908.
- [17] CALMETTE, MASSOL, BRETON. *C. R. Soc. Biol.*, 65, 1908.
- [18] JULIEN. *C. R. Soc. Biol.*, 93, 1925.
- [19] SHOPE. *Journ. of Ex. Med.*, 48, 1928.
- [20] (r) CORPER, LURIE, KRETSCHMER. *Journ. of Hyg.*, 1929.
- [21] BARTEL, NEUMAN, LEIMSNER. *Zbl. f. Bakt.* I, O, 1010, 56.
- [22] (r) SCHROEDER. *Beitr. z. Klin. Tbk.*, 1912.
- [23] PARCON JAVINI. *C. R. Soc. Biol.*, 78, 1913.
- [24] FRUGONI. *Zbl. f. Bakt.*, I, O, 53, 1910.
- [25] MOUREAU et GRUVEL. *C. R. Soc. Biol.*, 95, 1926.
- [26] CANCEK i MAZEPOWA. Cité d'après KOLLE et WASSERMANN, 9, 1929.
- [27] (r) MORITZ ALLAN. *Proc. Soc. exp. Biol.*, M., 1928.
- [28] NYREN. *Biert. z. Klin. d. Tbk.*, 73, 1929.
- [29] LOMINSKY. *C. R. Soc. Biol.*, 1930.
- [30] (r) CALMETTE et GUÉRIN, *C. R. Ac. Sc.*, 148; CALMETTE et GUÉRIN. *C. R. Ac. Sc.*, 149.
- [31] CANCEK MAZEPOWA. Cité d'après KOLLE et WASSERMANN, 9, 1929.
- [32] BESREDKA. A. P., 1921.
- [33] DORSET. Cité d'après KOLLE et WASSERMANN, 9, 1929.
- [34] LUBENAU. Cité d'après KOLLE et WASSERMANN, 9, 1929.
- [35] PARK et KRUMVIEDE. Cité d'après KOLLE et WASSERMANN, 9, 1929.
- [36] PETROFF. Cité d'après KOLLE et WASSERMANN, 9, 1929.
- [37] HOHN. Cité d'après KOLLE et WASSERMANN, 9, 1929.
- [38] WEISE. Cité d'après KOLLE et WASSERMANN, 9, 1929.
- [39] PETRAGNANI. Cité d'après KOLLE et WASSERMANN, 9, 1929.
- [40] WILLIAMS. *Journ. of Bact.*, 1916.
- [41] DANIEL BRUMET, ROLLAND. *C. R. Ac. Sc.*, 1911.
- [42] CALMETTE. L'Infection bacillaire et la Tuberculose, 1922.
- [43] MUCH. *Zbl. F. Bakt.*, I, O, 116, 1930.
- [44] MUCH. *M. med. Wchft.*, 1928.
- [45] MUCH. *M. med. Wchft.*, 1928.
- [46] MUCH. *M. med. Wchft.*, 1927.
- [47] CALMETTE, BOQUET, NÈGRE. *Ces Annales*, 35, 1921.
- [48] CALMETTE, BRETON. *C. R. Acad. Sciences*, 142.
- [49] NÈGRE, BOQUET, VALTIS. *C. R. Soc. Biol.*, 101, 1929.
- [50] A. CALMETTE. *Ac. de Méd.*, 1926; A. CALMETTE. *Ces Annales*, 40, 1926.
- [51] ARIMA, AOYOMA, CHNAWA. *D. Med. Woch.*, 1924.
- [52] KENDALL. *Journ. of Inf. Diseases*, 1919.
- [53] A. CALMETTE. *Ces Annales*, 35, 1921.
- [54] A. CALMETTE. *Ces Annales*, 34, 1920.

- [55] A. CALMETTE. *Bull. Acad. de Méd.*, 91.
- [56] CALMETTE et GUÉRIN. *Ces Annales*, 38, 1924.
- [57] MOELLER, KOLLE et WASSERMANN, 5, 1928.
- [58] MAGISTRIS. *Ergebn. d. Physiologie*, 1931, B, 30.
- [59] DEGWITL. *Ergebn. d. Physiologie*, 1931, B, 32.

(r) Signifie les travaux dont nous n'avons pu prendre connaissance que par les résumés publiés dans le *Bulletin de l'Institut Pasteur* et dans le *Zentralblatt für Bakteriologie*.

(*Institut de Médecine Vétérinaire et Expérimentale de l'Université Jagellon, Cracovie, Professeur J. NOWAK; Laboratoire de Bactériologie, Professeur M. GIESZCZYKIEWICZ.*)

L'INFLUENCE DE L'HYPERTHERMIE, DE L'ACIDOSE ET DE L'ALCALOSE SUR LA PRODUCTION DES AGGLUTININES

par J. DAVESNE et P. HABER.

L'injection à un organisme d'un antigène quelconque s'accompagne dans la plupart des cas d'une élévation de la température plus ou moins marquée; ce fait s'observe notamment pour toutes les vaccinations antimicrobiennes.

On sait, d'autre part, que l'adjonction à l'antigène de substances non spécifiques permet de renforcer l'immunisation. G. Ramon a montré l'intérêt que l'on pouvait attendre de cette pratique en ce qui concerne les vaccinations antitoxiques. L'un de nous a signalé que le taux du pouvoir agglutinant du sérum était notablement plus élevé si l'on injectait, en même temps que l'antigène, du sérum normal, du sang, du nucléinate de soude ou de la peptone.

Ces diverses substances provoquent une réaction générale de l'organisme, qui se traduit, entre autres symptômes, par une hyperthermie plus ou moins élevée.

Le mécanisme de cette élévation de température est certainement complexe. Il nous a semblé intéressant d'essayer de dissocier, parmi les diverses réactions de l'organisme, l'importance de l'hyperthermie sur la production et la modification du taux du pouvoir agglutinant.

Dans nos expériences nous avons étudié l'hyperthermie provoquée par l'injection de vaccin ou par l'injection d'une substance pharmacodynamique, la β -Tétrahydronaphtylamine.

Richard Stern (1889) a signalé le premier l'action hyperthermisante de cette substance, qu'il a étudiée chez le lapin, le chien et l'homme; Jonescu (1909) en a précisé le mode d'action et conclu de son étude que l'élévation de la température qu'elle

provoque provient surtout de son action sur le centre thermorégulateur. Ferri (1911) a montré que l'hyperthermie due à l'injection de T. H. N. (1) était différente de celle qui suit l'injection de *B. coli*, n'étant pas sensible à l'action des antipyrétiques. P. Regniers (1928) en étudiant l'influence de la T. H. N. sur la température et les échanges respiratoires a constaté une augmentation du volume respiratoire et une augmentation de l'élimination respiratoire du CO₂, et confirmé que l'antipyrine n'empêche pas l'action hyperthermisante de la T. H. N. Pour Jean J. Bouckaert et C. Heymans (1928), ni l'ergotamine, ni l'insuline, n'influencent l'hyperthermie naphtylaminique. C. Heymans et Jean J. Bouckaert (1930) notent que l'action de la T. H. N. sur les fibres musculaires lisses des vaisseaux n'est pas modifiée par la yohimbine, qui paralyse les éléments nerveux.

Dans d'autres travaux, Hashimoto, Mutch et Pembrey, Ott et Scott, pensent, comme Jonescu, que l'origine de l'hyperthermie naphtylaminique est centrale; Isenschmid a cependant observé de l'hyperthermie chez le lapin, après exclusion des centres thermorégulateurs.

J. Dadlez et W. Koskowsky (1930) distinguent deux types essentiels de fièvre expérimentale. L'un, le type central, représenté par la fièvre provoquée par excitation des centres nerveux, et dans lequel le métabolisme hydrocarboné ne joue aucun rôle: le métabolisme chimique n'a aucune relation causale avec l'augmentation de la température du corps. Le second type est périphérique. La fièvre y est provoquée par une combustion plus intense des hydrates de carbone, une décomposition plus rapide du glycogène hépatique et musculaire. Il existe en outre des types de fièvres mixtes, d'origine centrale et périphérique. Les auteurs classent la T. H. N. parmi les substances provoquant ce type de fièvre.

Enfin pour Tiffeneau, M^{lle} J. Lévy et D. Broun (1930), l'hyperthermie due à la T. H. N. est surtout d'origine centrale; ces auteurs ont montré, en outre, que l'alcalose favorise l'élévation de cette hyperthermie et que l'acidose la retarde.

(1) Dans ce travail T. H. N. = β -Tétrahydronaphtylamine.

RECHERCHES PERSONNELLES.

Dans une première série de recherches, nous avons cherché à établir l'importance, dans le développement des anticorps (agglutinines), de l'hyperthermie provoquée au moment de l'injection de l'antigène; dans une deuxième série de recherches, nous avons noté, chez l'animal déjà immunisé, les variations des anticorps (agglutinines), sous l'influence de l'hyperthermie provoquée.

INFLUENCE DE L'HYPERTHERMIE
SUR LA PRODUCTION DU POUVOIR AGGLUTINANT.

Nous avons effectué nos expériences avec deux séries d'animaux, chaque série comportant 10 lapins. Nous avons utilisé comme vaccin une émulsion de bacille histolytique, chauffé une heure à 60° (culture de vingt-quatre heures, centrifugée et reprise par l'eau physiologique). Le bacille histolytique est isolé assez rarement, et nous voulions éviter, pour nos expériences, l'erreur provenant d'anticorps spontanément développés. Avant l'immunisation, nous avons recherché le taux d'agglutination spontanée des sérums des animaux en expérience. Sur 20 sérums de lapins nous en avons trouvé 2 agglutinant le bacille histolytique à 1 p. 100 et nous avons utilisé ces deux animaux comme témoins.

Les animaux du premier lot ont tous reçu 3 injections intraveineuses, à quatre jours d'intervalle, de 0,5 cent. cube du vaccin utilisé et ont été saignés quatre jours après la dernière injection. Les animaux du deuxième lot ont reçu, aux mêmes dates, une même quantité de vaccin, et ont été saignés après le même délai; mais nous leur avons injecté, par voie intramusculaire, quelques instants avant l'injection intraveineuse de vaccin, des doses, variables suivant leur poids, de T. H. N. Chez tous nos animaux, nous avons pris la température avant l'injection d'antigène et deux heures après.

Dans les travaux que nous avons cités précédemment, les auteurs ont employé comme dose hyperthermisante de T. H. N. de 3 à 5 centigrammes par kilogramme d'animal. Nous avons d'abord utilisé la dose de 2 centigrammes, puis de 1 centigramme

par kilogramme. Voici les résultats que nous avons obtenus :

Animaux témoins : 3 injections intraveineuses de 0 c.c. 5 de vaccin.

LAPINS	POIDS en kilogrammes	1 ^{re} INJECTION 0 c.c. 5 de vaccin température en degrés		2 ^e INJECTION 0 c.c. 5 de vaccin température en degrés		3 ^e INJECTION 0 c.c. 5 de vaccin température en degrés		TAUX AGGLUTINANT 5 jours après la 3 ^e injection
		avant	2 h. après	avant	2 h. après	avant	2 h. après	
C 100	1,750	40	40 4/10	39 5/10	40	39 5/10	40 2/10	1 : 1.000.
C 99	2,150	39 2/10	40 4/10	39 8/10	40 5/10	40	40 8/10	1 : 2.500.
C 98	2,250	40	41	39 8/10	40 6/10	40	40 5/10	1 : 2.000.
C 97	2,450	39 5/10	40	39 5/10	40 2/10	39 2/10	40 6/10	1 : 1.500.
C 96	1,650	40	40 2/10	39 5/10	40 8/10	39 5/10	41	1 : 2.500.
C 95	2,450	40	41					Mort 4 jours après la 1 ^{re} injection.
C 94	2,200	40 1/10	40 5/10	40	41 5/10	39 8/10	40 8/10	1 : 2.000.
C 93	2,450	40	40 5/10					Mort 5 jours après la 1 ^{re} injection.
C 92	2,450	39 8/10	41	40	40 2/10	40 2/10	40 2/10	1 : 1.000.
C 91	1,600	39 8/10	40 4/10	39 5/10	41	40	41 2/10	1 : 1.500.

N. B. — Au cours de l'immunisation nous avons perdu deux animaux d'infection intercurrente.

Animaux hyperthermisés : première injection de 0 c.c. 5 de vaccin et 2 centigrammes de T. H. N. par kilogramme d'animal.

LAPINS	POIDS en kilogrammes	DOSE DE T. H. N. par kilogramme d'animal en centigrammes	TEMPÉRATURE avant l'injection en degrés	TEMPÉRATURE 2 heures après l'injection
C 90.	2,650	2	39 8/10	44°.
C 89.	2,700	2	39 8/10	Mort 1 h. 1/2 après.
C 88.	2,300	2	39 2/10	41° 4/10.
C 87.	2,600	2	39 8/10	Mort 1 h. 1/2 après.
C 86.	2,450	2	39 2/10	42°.
C 85.	2	2	39 8/10	41°.
C 84.	1,750	2	39 8/10	41°.
C 83.	2,600	2	39 8/10	41° 2/10.
C 82.	2,650	2	40	Mort 1 h. 1/2 après.
C 81.	2,350	2	40	40° 5/10.

Nos expériences appellent plusieurs considérations. Tout d'abord, l'action de la T. H. N., bien que nous ayons utilisé des doses considérées par les auteurs comme non mortelles, s'est surajoutée au point de vue hyperthermisant à l'élévation de température provoquée par l'injection de vaccin. Ces deux

facteurs hyperthermisants, surajoutés, ont provoqué, dès la première injection, la mort de 3 lapins sur 10, à la deuxième injection, celle de 3 lapins et la troisième celle de 2 lapins.

Animaux hyperthermisés : deuxième injection de 0 c. c. 5 de vaccin et 1 centigramme de T. H. N. par kilogramme d'animal.

LAPINS	POIDS en kilogrammes	DOSE DE T. H. N. d'animal par kilogramme en centigrammes	TEMPÉRATURE avant l'injection en degrés	TEMPÉRATURE 2 heures après l'injection
C 90.	2,650	1	40	Mort après la 1 ^{re} in- jection.
C 88.	2,300			40°.
C 86.	2,450			Mort après la 1 ^{re} in- jection.
C 85.	2	1	40	43° 2/10.
C 84.	1,750	1	39 8/10	41°.
C 83.	2,600	1	40 2/10	Mort après la 1 ^{re} in- jection.
C 81.	2,350			40° 2/10.

Animaux hyperthermisés : troisième injection de 0 c. c. 5 de vaccin et 1 centigramme de T. H. N. par kilogramme d'animal.

LAPINS	POIDS en kilogrammes	DOSE DE T. H. N. par kilogramme d'animal en centigrammes	TEMPÉRATURE avant l'injection en degrés	TEMPÉRATURE 2 heures après l'injection en degrés	TAUX agglutinant 5 jours après la 3 ^e injection
C 88 C 85	2,300 2	1	40	40 5/10	1 : 2.500. Mort après la 2 ^e injection.
C 84	1,750	1	40 1/10	41 5/10	Mort après la 3 ^e injection.
C 81	2,350	1	40	41	1 : 3.000.

Remarquons que, dans nos expériences, contrairement au fait signalé par Gugenheim, une seconde injection de T. H. N. a pu produire l'hyperthermie. Il est vrai que nous avons toujours associé la T. H. N. à un vaccin.

Si nous considérons les résultats globaux de nos recherches, nous constatons que les animaux produisant un fort sérum agglutinant sont ceux qui ont présenté, au moment de l'injection d'antigène, une plus forte élévation de température, que la T. H. N. ait été ou non associée au vaccin utilisé.

Cette constatation nous permet de saisir une des causes du

renforcement de l'immunisation par des facteurs non spécifiques, les substances non spécifiques provoquant presque constamment une élévation marquée de la température.

INFLUENCE DE L'ALCALOSE ET DE L'ACIDOSE SUR LA RÉACTION THERMIQUE VACCINALE.

Les expériences précédentes nous ont montré l'importance de l'hyperthermie provoquée au moment de l'injection de l'antigène microbien dans le développement du pouvoir agglutinant.

D'autre part, Tiffeneau, M^{lle} J. Lévy et D. Broun ont établi que l'alcalose favorise et que l'acidose retarde l'élévation de température provoquée par la T. H. N. Nous avons voulu voir si l'alcalose ou l'acidose réalisées au moment de l'injection de vaccin avaient une influence sur la réaction thermique vaccinale.

Nous avons suivi la technique de Tiffeneau, M^{lle} J. Lévy et D. Broun, qui consiste à injecter lentement, dans la veine du lapin, 20 cent. cubes de soude caustique à n/8, ou 20 cent. cubes d'acide chlorhydrique à n/2. Nous avons employé 12 lapins. 4 témoins ont reçu par voie intraveineuse 0 c. c. 5 de vaccin (culture de vingt-quatre heures de bacille histolytique, centrifugée, reprise par l'eau physiologique et chauffée une heure à 60°). 8 lapins ont reçu dans les mêmes conditions la même dose de vaccin, 4 immédiatement après l'injection de soude, et 4 autres immédiatement après celle d'acide. Nous avons pris les températures des animaux avant l'injection et une heure, deux heures, trois heures, quatre heures, cinq heures, six heures, sept heures et vingt-quatre heures après l'injection.

Les tableaux suivants rendent compte des résultats obtenus.

Témoins (vaccins 0 c. c. 5).

LAPINS	POIDS (en kilogrammes)	INJECTION de vaccin (en cent. cubes)	TEMPÉRATURE EN DEGRÉS APRÈS								
			Avant	1 h.	2 h.	3 h.	4 h.	5 h.	6 h.	7 h.	24 h.
C 64	2,100	1/2	39,4	40	40,2	40,4	40	39,8	39,8	39,8	39,2
C 63	2,140	1/2	39	39	39,9	39,7	39,2	39,2	39,2	39,2	39
C 50	2,200	1/2	40	40,4	40,6	39,6	39,2	39,8	39,8	39,9	39,8
C 44	2,200	1/2	39,5	40,2	40,6	40,1	40	39,8	39,8	39,6	39,9

Animaux alcalinisés (vaccin et solution n/8 de NaOH).

LAPINS	POIDS (en kilogrammes)	INJECTION DE	TEMPÉRATURE EN DEGRÉS APRÈS								
			Avant	1 h.	2 h.	3 h.	4 h.	5 h.	6 h.	7 h.	24 h.
C 62	2,580	vaccin : 1/2 c. c. + $\text{NaOH } \frac{\text{N}}{8} : 20 \text{ c. c.}$	40	40	40,2	40	39,2	39,2	39,5	39,8	40
C 61	2,450	vaccin : 1/2 c. c. + $\text{NaOH } \frac{\text{N}}{8} : 20 \text{ c. c.}$	38,8	38,9	40	39,4	39,2	39,4	39,1	39	39,2
C 50	2,350	vaccin : 1/2 c. c. + $\text{NaOH } \frac{\text{N}}{8} : 20 \text{ c. c.}$	39,2	40	40,2	39,8	39,5	39,2	39,2	39,2	39
C 54	2,400	vaccin : 1/2 c. c. + $\text{NaOH } \frac{\text{N}}{8} : 20 \text{ c. c.}$	39,2	39,2	40,1	40	40	40	40	39,8	39,4

Animaux acidosés (vaccin et solution n/2 de HCl).

LAPINS	POIDS en kilogrammes	INJECTION DE	TEMPÉRATURE EN DEGRÉS APRÈS								
			Avant	1 h.	2 h.	3 h.	4 h.	5 h.	6 h.	7 h.	24 h.
C 60	2,320	Vaccin : 1/2 c. c. + $\text{HCl } \frac{\text{N}}{2} : 20 \text{ c. c.}$	39,8	39,8	40,4	40,4	39,5	39,5	39,4	39,6	39,8
C 59	2,050	Vaccin : 1/2 c. c. + $\text{HCl } \frac{\text{N}}{2} : 20 \text{ c. c.}$	39,2	38,8	40	40,5	40,6	40,4	40,8	41,3	40
C 43	2,100	Vaccin : 1/2 c. c. + $\text{HCl } \frac{\text{N}}{2} : 20 \text{ c. c.}$	39,4	38	38,9	38,9	39	39,8	39,2	39	38,9
C 42	2,250	Vaccin : 1/2 c. c. + $\text{HCl } \frac{\text{N}}{2} : 20 \text{ c. c.}$	39,2	39	40,1	40	39,2	39,3	39,2	39,2	39,3

Ainsi, nous avons noté des élévations de température allant de 6/10 à 1° 2/10, atteignant leur maximum deux heures après l'injection, pour revenir ensuite à la température initiale. Les 4 lapins alcalinisés et 2 lapins acidosés se sont comportés absolument comme les témoins. Chez 2 lapins acidosés, l'hyperthermie n'a pas été plus accusée, mais elle a été plus tardive et a été précédée d'une baisse de température de 1/2 et de 1°.

Dans ces conditions, la réaction thermique vaccinale ne semble pas être due à une action sur le centre thermorégulateur.

INFLUENCE DE L'ALCALOSE ET DE L'ACIDOSE SUR LA PRODUCTION DES AGGLUTININES.

En même temps que les expériences précédentes, nous avons entrepris des recherches pour préciser l'influence de l'alcalose ou de l'acidose provoquées au moment de l'injection de vaccin sur le développement du pouvoir agglutinant. Nous avons réalisé l'alcalose et l'acidose avec la technique déjà décrite. 12 lapins ont reçu par voie intraveineuse 0 c. c. 5 de vaccin, soit 4 témoins, 4 après injection de soude et 4 après injection d'acide. Le résultat de cette expérience est noté au tableau de la page suivante :

Les résultats de nos recherches s'opposent ainsi à ceux obtenus par A. M. Bonanno (1931). Cet auteur, en administrant un régime approprié à des cobayes ou à des lapins pendant un temps plus ou moins long (de quinze à trente jours) est parvenu à déterminer des modifications qui intéressaient surtout la réserve alcaline, le *pH* des urines et plus modiquement le *pH* du sang. Il a constaté que les animaux soumis à un régime alcalinique produisaient un sérum légèrement plus actif au point de vue agglutinant que celui des animaux témoins, alors qu'un régime acidosique était nuisible à la formation des agglutines. Auparavant, Homer F. Swift (1922) avait déjà montré que l'administration de salicytate de soude au lapin diminue remarquablement la formation des anticorps. Remarquons toutefois que nous nous sommes placés à un point de vue différent de celui de cet auteur. Nous n'avons cherché à étudier que les modifications produites dans l'organisme *au moment même* de l'injection d'antigène. Il est bien évident qu'après un

LAPINS	POIDS en kilogrammes	INJECTION DE	AGGLUTINATIONS	
			avant	7 jours après
C 80	2,300	Vaccin : 1/2 c. c.	0	1 : 1.000
C 79	2,150	Vaccin : 1/2 c. c.	1 : 20	1 : 1.000
C 72	2,240	Vaccin : 1/2 c. c.	0	1 : 200
C 71	2,200	Vaccin : 1/2 c. c.	0	1 : 1.000
C 76	2,350	Vaccin : 1/2 c. c. NaOH $\frac{N^+}{8}$: 20 c. c.	0	1 : 1.000
C 75	2,200	Vaccin : 1/2 c. c. NaOH $\frac{N^+}{8}$: 20 c. c.	1 : 30	1 : 900
C 70	2,400	Vaccin : 1.2 c. c. NaOH $\frac{N^+}{8}$: 20 c. c.	1 : 20	1 : 1.000
C 69	2,250	Vaccin : 1/2 c. c. NaOH $\frac{N^+}{8}$: 20 c. c.	0	1 : 900
C 74	2,100	Vaccin : 1/2 c. c. HCl $\frac{N^+}{2}$: 20 c. c.	0	1 : 1.000
C 73	2,300	Vaccin : 1/2 c. c. HCl $\frac{N^+}{2}$: 20 c. c.	0	1 : 700
C 68	2,250	Vaccin : 1/2 c. c. HCl $\frac{N^+}{2}$: 20 c. c.	1 : 20	1 : 800
C 67	2,400	Vaccin : 1/2 c. c. HCl $\frac{N^+}{2}$: 20 c. c.	1 : 30	1 : 800

laps de temps relativement court, la solution acide ou alcaline introduite par voie veineuse est éliminée, et l'organisme se rééquilibre.

INFLUENCE DE L'HYPERTHERMIE

SUR LE TAUX DU POUVOIR AGGLUTINANT CHEZ L'ANIMAL IMMUNISÉ.

Nous avons ensuite étudié les variations du pouvoir agglutinant du sérum chez l'animal immunisé, sous l'influence de l'hyperthermie provoquée par l'injection intramusculaire de T. H. N.. 4 lapins précédemment immunisés par trois injections intraveineuses de vaccin anti-histolytique ont reçu 2 centigrammes par kilogramme de T. H. N. Nous avons noté les modifications de la température et celles du pouvoir agglutinant une, deux, quatre, huit et vingt-quatre heures après l'injection.

LAPINS	POIDS en kilogrammes	INJECTION DE	TEMPÉRATURE EN DEGRÉS APRÈS					
			Avant	1 h.	2 h.	4 h.	8 h.	24 h.
C 98	2,250	2 centigr. de β . T. H. N. par kilogr.	40	40,6	40,2	40,2	40,1	40,2
C 94	2,200	2 centigr. de β . T. H. N. par kilogr.	39,5	40,5	40	39,5	39,8	39,6
C 100	1,750	2 centigr. de β . T. H. N. par kilogr.	40	40,8	40,2	39,8	40,4	39,2
C 96	1,650	2 centigr. de β . T. H. N. par kilogr.	39,8	39,5	39,8	40,2	40,5	39,5

LAPINS	POIDS en kilogrammes	INJECTION DE	AGGLUTINATIONS APRÈS					
			Avant	1 h.	2 h.	4 h.	8 h.	24 h.
C 98	2,250	2 centigr. de β . T. H. N. par kilogr.	1 : 2.000			1 : 2.000	1 : 2.000	1 : 2.000
C 94	2,200	2 centigr. de β . T. H. N. par kilogr.	1 : 2.500	1 : 2.750	1 : 2.750	1 : 2.500	1 : 2.500	1 : 2.500
C 100	1,750	2 centigr. de β . T. H. N. par kilogr.	1 : 1.000	1 : 1.500	1 : 1.250	1 : 1.000	1 : 1.000	1 : 1.000
C 96	1,650	2 centigr. de β . T. H. N. par kilogr.	1 : 1.250	1 : 1.500	1 : 1.750	1 : 1.750	1 : 2.250	1 : 2.000

Les tableaux montrent nettement qu'une augmentation sensible du pouvoir agglutinant s'est manifestée en même temps que l'augmentation de la température.

CONSIDÉRATIONS GÉNÉRALES.

1° La première partie de nos recherches a démontré l'influence favorable de l'hyperthermie sur le développement du pouvoir agglutinant, qu'une substance hyperthermisante soit ou non associée au vaccin injecté. Il est d'ailleurs bien connu que, plus la réaction de l'organisme est marquée au moment de l'injection d'antigène, plus l'immunité obtenue est forte.

Les « antigènes au tapioca » de G. Ramon, en permettant une meilleure assimilation de la toxine, provoquent des réactions à la fois locales et générales. De même, les vaccins associés de Zoeller et Ramon, qui confèrent une immunité plus active contre plusieurs germes ou toxines qu'une vaccination monovalente.

D'après nos expériences, il n'est pas interdit de penser que l'hyperthermie, manifestée lors de ces injections d'antigène, peut permettre d'évaluer les possibilités de l'organisme à être favorablement sollicité par la vaccination.

Nous avons noté, en outre, que l'alcalose et l'acidose réalisées au moment de l'injection d'antigène sont sans effet notable sur la réaction thermique vaccinale et, par suite, sur le développement du pouvoir agglutinant. Mais nos expériences dans cet ordre ne permettent pas de juger définitivement de l'importance de l'alcalose et de l'acidose, en raison du caractère transitoire des modifications de la réaction sanguine que nous avons provoquées.

2° La seconde partie de notre travail nous a permis de constater, sous l'influence de l'hyperthermie provoquée par la T. H. N., une augmentation du taux du pouvoir agglutinant, qui a suivi parallèlement l'élévation de la température. Dans des travaux antérieurs, l'un de nous, avec C. Sanchez, avait observé, sous l'influence des chocs protéiniques (injection de sérum normal, de peptone, de nucléinate de soude), des variations notables du pouvoir agglutinant spontané ou développé après immunisation.

Ces faits s'opposent nettement aux constatations faites par G. Ramon dans l'étude du pouvoir antitoxique. Autant le pou-

voir antitoxique reste stable, non influencé par les causes les plus diverses, et ne peut être accru que par une nouvelle dose d'antigène, véritable aliment indispensable à son élaboration, suivant l'expression de G. Ramon, autant le pouvoir agglutinant nous semble susceptible d'être modifié par des actions nombreuses. Toute cause perturbatrice de l'équilibre harmonieux de l'organisme, toute action modifiant momentanément les conditions habituelles de son comportement, est caractérisée par une élévation plus ou moins passagère et plus ou moins prononcée du taux de l'agglutination du sérum. Le pouvoir agglutinant apparaît ainsi comme un réactif sensible à toutes les causes pathogènes; il sert de témoin à la réaction organique qui s'effectue.

Il est permis de penser que l'hyperthermie exalte le pouvoir phagocytaire vis-à-vis de microbes conservés à l'état latent dans l'organisme. En effet, nous savons, grâce à des recherches inédites de Weinberg et Combiesco, que des microbes injectés peuvent subsister intacts, dans les organes profonds (foie et rate), pendant des mois.

Cette action favorable de l'hyperthermie ne se limite pas à la lutte contre les seuls agents microbiens; on a signalé la plus grande efficacité d'un médicament associé à une substance pyrétogène, et récemment, Pasteur Valéry-Radot et ses collaborateurs, et Bezançon et Jacquelin, signalaient l'action suspensive de l'hyperthermie sur les crises d'asthme, et les premiers de ces auteurs, en expérimentant sur le lapin, notaient, dans l'anaphylaxie expérimentale, l'effet désensibilisant d'une injection seconde pratiquée chez l'animal hyper- ou hypothermisé.

Signalons cependant que des recherches récentes de C. Levaditi, J. Auclair et A. Vaisman (1932) ont montré que la pyrétothérapie réalisée par ondes courtes est sans influence sur la fièvre récurrentielle du rat.

En résumé, l'hyperthermie, développée chez l'animal au moment de l'immunisation, nous semble d'autant plus favorable à la production des anticorps microbiens qu'elle est plus prononcée. L'hyperthermie vaccinale n'est pas influencée par l'acidose ni par l'alcalose expérimentales. Chez l'animal immunisé, l'hyperthermie réalisée par une action directe sur le sys-

tème nerveux provoque, comme toutes les perturbations subites de l'équilibre organique, une élévation du taux du pouvoir agglutinant.

(*Institut Pasteur, laboratoire de M. Weinberg.*)

BIBLIOGRAPHIE

- BEZANÇON (F.) et JACQUELIN (A.), Asthme et fièvre. *Presse méd.*, n° 92, 1931, p. 1685.
- BONANNO, Formation d'agglutinines dans le cobaye soumis au régime acidosique et alcalosique, *Bollet. Soc. internat. di Microbiol.*, 7, fasc. 10, 1931, p. 654.
- BOUCKAERT et HEYMANS, β -Tétrahydronaphtylamine et Ergotamine. *Arch. internat. de Pharm. et de Thérap.*, 35, 1928, p. 137.
- BOUCKAERT et HEYMANS, Hyperthermie et hyperglycémie par la β -tétrahydronaphtylamine. *Arch. internat. de Pharm. et de Thérap.*, 35, 1928, p. 153.
- DADLEZ et KOSKOWSKY, Les critères biochimiques dans la classification de la fièvre expérimentale, *Arch. internat. de Pharm. et de Thérap.*, 38, 1930, p. 363.
- DAVESNE et HABER, Influence de l'hyperthermie sur la protection et la variation du taux du pouvoir agglutinant. *C. R. de la Soc. de Biol.*, 108, 1931, p. 766.
- DAVESNE et HABER, Influence de l'alcalose et de l'acidose sur la réaction thermique vaccinale, sur la production des agglutines et sur la résistance à une toxine microbienne. *C. R. de la Soc. de Biol.*, 108, 1931, p. 1053.
- DAVESNE (J.), Variations chez l'animal immunisé du taux des anticorps spécifiques (agglutinines) sous l'influence des chocs protéidiques. *C. R. de la Soc. de Biol.*, 99, 1928, p. 571.
- DAVESNE (J.) et SANCHEZ (C.), Influence des injections de sérum et de nucléinate de soude sur le taux du pouvoir agglutinant spontané du sérum, *C. R. de la Soc. de Biol.*, 101, 1929, p. 207.
- DAVESNE (J.). Action favorable des injections de peptone, de sang et de sérum, sur le développement du pouvoir agglutinant du sérum. *C. R. de la Soc. de Biol.*, 97, 1927, p. 1061.
- FÉRI, Zur Wirkung der antipyretica. *Arch. internat. de Pharm. et de Thérap.*, 21, 1911, p. 26.
- FREUND, Die pharmakologischen Probleme der fieberhaften Erkrankungen. *D. med. Wschr.*, 23, 1931, p. 963.
- GUGENHEIM, *Die biogenen Amine*, p. 251.
- HACHIMOTO, *Pflüger's Arch.*, 78, 1899, p. 405.
- HEYMANS et BOUCKAERT, Influence de la yohimbine sur les réflexes du sinus carotidien, l'hypertension asphyxique et l'hypertension par la pituitrine et la tétrahydronaphtylamine. *Arch. internat. de Pharm. et de Thérap.*, 38, 1930, p. 325.
- HOMER F. SWIFT, The action of sodium salicylate upon the formation of immune bodies. *Journ. exp. Med.*, 36, 1922, p. 761.

- ISENSCHMID, *Arch. f. exper. Pathol. u. Pharmacol.*, **85**, 1920, p. 271.
- JONESCU. *Pharmakologische Untersuchungen über tetrahydronaphtylamine*.
Arch. f. exper. Pathol. u. Pharmacol., **60**, 1909, p. 345.
- LEVADITI (C.), AUCLAIR (J.), VAISMAN (A.), Influence de la pyrétothérapie (Ondes courtes) sur l'évolution de l'infection récurrentielle du rat. *C. R. de la Soc. de Biol.*, **109**, 1932, p. 84.
- MUTCH et PEMBREY. *Journ. of. Physiol.*, **43**, 1911-1912, p. 109.
- OTT et SCOTT. *Journ. experim. Med.*, **9**, 1907, p. 671.
- PASTEUR VALÉRY-RADOT, MAURIC et M^{me} HUGO, Influence de l'hyperthermie et de l'hypothermie sur le choc anaphylactique du lapin. *C. R. de la Soc. de Biol.*, **108**, 1931, p. 649.
- PASTEUR VALÉRY-RADOT, MAURIC et M^{me} HUGO, Influence des modifications thermiques sur certains phénomènes de sensibilisation. *Presse méd.*, n° 100, 1931, p. 1846.
- PASTEUR VALÉRY-RADOT et MAURIC (G.), Influence de la température sur les crises d'asthme de l'adulte. *Soc. méd. des Hôp.*, **21**, 1931, p. 1046-1064.
- RAMON et ZOELLER, Les « vaccins associés » par union d'une anatoxine et d'un vaccin microbien ou par mélange d'anatoxines. *C. R. de la Soc. de Biol.*, **94**, 1926, p. 106.
- RAMON (G.), Procédés pour accroître la production des antitoxines. *Ces Annales*, **40**, 1926, p. 1.
- RÉGNIERS, Influence de la tétrahydronaphtylamine sur la température et les échanges respiratoires, action antagoniste de la chloralose et de l'antipyrine. *Arch. internat. de Pharm. et de Thérap.*, **35**, 1928, p. 70.
- STERN, Ueber die Wirkung der Hydronaphtylamine auf den tierischen Organismus. *Virchow's Archiv.*, **14**, 1889, p. 115.
- TIFFENEAU, M^{lle} LÉVY et BROUN (D.), Influence des variations de la réserve alcaline et du pH sur quelques actions pharmacodynamiques centrales et périphériques. *Arch. internat. de Pharm. et de Thérap.*, **33**, 1930, p. 463.

**CONTRIBUTION A L'ÉTUDE
DES RÉACTIONS DE QUELQUES INVERTÉBRÉS
A L'INOCULATION
DE SUBSTANCES A PROPRIÉTÉS CANCÉRIGÈNES
ET DU *BACTERIUM TUMEFACIENS* Sm. et Town,**

par J -ANDRÉ THOMAS,

I. — INTRODUCTION.

Les invertébrés ne font que très exceptionnellement des réactions tumorales. On a souvent décrit chez eux des processus réactionnels ou d'enkystement autour de parasites, mais on peut dire, à part quelques cas spéciaux et discutés comme celui de certains Lamellibranches, ou celui de la mouche du vinaigre *Drosophila melanogaster* étudié par Miss M. B. Stark (1918), que les tumeurs malignes spontanées sont inconnues chez ces animaux. J'ai d'ailleurs fait l'historique de cette question dans un travail antérieur (1930 a). Il convient toutefois de rappeler les recherches expérimentales de A. Labbé (1930) qui a inséré des stylets de celloïdine trempés dans du goudron dans le manteau d'un gastéropode *Doris tuberculata* Cuv. Cet auteur a obtenu ainsi une réaction tissulaire qu'il désigne comme « un processus cancérigène d'origine fibroblastique différant en beaucoup de points de celui des Mammifères ». On conçoit l'intérêt théorique de la réalisation expérimentale de processus d'ordre néoplasique chez les invertébrés, ce qui, en même temps, constitue une contribution au problème phylogénétique du cancer.

De 1928 à 1930, je me suis attaché à élucider un mode très particulier et fréquent de formation de tumeurs bénignes chez l'annélide polychète *Nereis diversicolor* O. F. Müll.; ce sont ces études qui m'ont amené à entreprendre les nouvelles recherches résumées dans ce mémoire. Cet annélide vit dans la

vase des estuaires à dessalure progressive. Sa zone de répartition va de l'eau de mer à salure normale (on la trouve même dans les marais salants), jusqu'à l'eau douce. On croyait donc que cette espèce présentait une adaptation remarquable et complète aux variations de la salure du milieu extérieur. Mais, en réalité, cette adaptation est loin d'être totale (1930 *b*). L'annélide ne vit dans des milieux si différents que d'une façon très paradoxale, et sa taille, sa fréquence par gisements, sa sexualité enfin, paraissent directement influencées par la richesse de l'eau en chlorures. Dans le cas du phénomène qui nous intéresse ici, une statistique faite sur 3.226 individus montre que le nombre des tumeurs croît jusqu'à un certain maximum (16 p. 100 environ), comme la dessalure de l'eau, ce qui correspond d'autre part à une dégénérescence de plus en plus fréquente des oocytes dans la cavité générale des *Nereis*. L'étude microscopique et expérimentale de nombreuses néoformations à divers stades (1930 *a*) révéla en effet que ce sont les substances libérées dans le coelome par les oocytes en dégénérescence (nécrohormones) qui sont responsables de ces tumeurs, en déclenchant une lymphogénèse intense et désordonnée. Les îlots d'œufs dégénérés provoquent un granulome réactionnel qui est envahi progressivement par les cellules lymphoïdes. Des cellules spéciales, les linocytes, deviennent géantes et se transforment en cellules fibroblastiques, s'organisant en un tissu néoformé dont les fibres dérivent directement des filaments intracellulaires constituant le linome. La croissance de ce nouveau tissu bouleverse les rapports normaux des organes et aboutit à la formation de tumeurs très volumineuses, mais qui demeurent bénignes (1). Ce processus peut, en outre, être reproduit expérimentalement par inoculation de broyat de tumeurs contenant des oocytes dégénérés, indépendamment de toute action microbienne. On peut constater encore que le tube digestif des *Nereis diversicolor* réagit, par des néoformations particulièrement volumineuses, au parasitisme des Grégarines. Il paraissait donc indiqué d'utiliser cette

(1) Ce phénomène est très général. J'ai trouvé de nombreuses *Nereis diversicolor* tumorales dans la région de Roscoff en 1928, 1929 et 1931. D'autre part, M. R. Poisson (communication personnelle) a pu observer 6 individus tumoraux sur 34 en août 1930, dans les vases salées de l'embouchure de l'Orne, à Merville.

espèce pour des recherches sur les facteurs cancérigènes et inflammatoires en comparant toutefois ses réactions à celles de quelques autres invertébrés convenablement choisis.

Certaines substances, en effet, jouissent de la propriété de provoquer des tumeurs malignes dans quelques cas, chez des invertébrés particuliers comme la poule et le rat principalement. Mais elles ne paraissent agir, en réalité, que mélangées à des cellules ou produits embryonnaires homologues. Les cas positifs publiés sont surtout les résultats de la transformation maligne d'embryomes expérimentaux. Cette cancérisation, malheureusement, a toujours été le fruit de l'empirisme. Les produits chimiques employés sont très divers et il est difficile de trouver entre eux un lien physique ou chimique commun.

Il suffira de rappeler brièvement, ici, que ces investigations ont été poursuivies pendant ces dernières années, à la suite des recherches d'Askanazy (1909-1926). Cet auteur a déterminé la transformation sarcomateuse d'embryomes expérimentaux du rat, grâce à l'action de certaines substances (eau éthérée, hydrate de chloral, arséniate de potasse, acide arsénieux, liqueur de Fowler, liqueur de Boudin). Plusieurs travailleurs ont obtenu de même quelques sarcomes expérimentaux, surtout chez la poule et le rat, en utilisant le goudron ou diverses solutions d'arsenic, d'indol, d'ionium, etc. Généralement les sarcomes de la poule provoqués par ces méthodes comme les deux cas de Murphy et Landsteiner (1924) sont greffables, mais non inoculables par filtrat. C'est pourquoi divers auteurs comme Deelman (1928), Begg et Cramer (1929), Maisin et Dupuis (1929), etc., à propos des sarcomes chimiques filtrables de la poule (Carrel 1925), ont pu écrire qu'il fallait se méfier des contaminations par le virus de Rous.

La seconde méthode qui paraissait convenir à la réalisation des recherches projetées était l'inoculation de l'agent des tumeurs végétales : le *Bact. tumefaciens* Smith et Townsend déjà inoculé à des animaux par quelques auteurs.

Si certains chercheurs comme récemment encore Kauffmann (1928), Borghi et Luzzato (1929) n'ont eu que des résultats négatifs chez les animaux, d'autres, par contre, ont produit des néoformations ou des infections généralisées.

Smith, le premier, inocule le *Bact. tumefaciens* à des ver-

tébrés poïkilothermes. Il obtient ainsi chez la truite des septicémies, avec présence du microbe dans l'aorte dorsale. Ce germe, isolé, produit à nouveau le crown-gall sur la betterave à sucre. Dans d'autres cas, il provoque dans la paroi abdominale et dans la cavité orbitaire de petites tumeurs qui ne donnent pas de métastases. Il s'agit, très probablement, de granulomes infectieux.

M^{lle} Kostritsky, M^{me} Toumanoff et Métalnikow (1924) déterminent une septicémie mortelle chez les chenilles de *Galleria mellonella* laissées à la température du laboratoire. Mais ces chenilles résistent si on les laisse à 37°, température qui ne convient pas à la pullulation du *Bact. tumefaciens*. Ces auteurs observent qu'en quatre et six heures les Bacilles sont transformés en granules capsulés, alors qu'il n'y a pas encore de phagocytes. Après vingt et vingt-quatre heures, ces granules (dont les auteurs n'ont malheureusement pas précisé les propriétés) ont disparu, faisant place à une race de *Bact. tumefaciens* un peu plus longs, adaptés aux chenilles, et qui se multiplient rapidement. Ces microbes sont phagocytés et provoquent la désagrégation des leucocytes qui disparaissent tous.

Amormino (1928) obtient seulement un abcès chez la tortue; mais l'inoculation de *Bact. tumefaciens* à la face interne de l'oreille du lapin provoque une réaction inflammatoire intéressante avec croissance épithéliale localisée, augmentation du tissu conjonctif, formation de cellules géantes et transformation osseuse du cartilage. Enfin, un poisson du genre *Carassius*, mort six mois après l'inoculation, présentait au niveau de celle-ci, dans la musculature de la queue, un nodule à cellules fusiformes avec des noyaux géants, mais sans caryocynèses et sans métastases. L'auteur n'hésite pas cependant à le qualifier de sarcome fusocellulaire. La cavité abdominale de ce poisson contenait de plus un liquide louche avec *Bact. tumefaciens* identifié, capable de provoquer une tumeur sur un pied d'Agave.

Signalons enfin que J. Cantacuzène (1928) s'est servi du *Bact. tumefaciens* dans ses recherches sur l'immunisation des invertébrés. Ce microbe provoque notamment des réactions d'agglutination très intéressantes des éléments du liquide cavitaires du Siponcle.

II. — MATÉRIEL ET TECHNIQUE.

J'ai cherché à réaliser des conditions expérimentales analogues à celles qui ont permis d'obtenir des cancers ou des réactions tumorales chez les vertébrés. J'ai choisi certains invertébrés qui me paraissaient être un matériel convenable, soit pour des raisons d'ordre zoologique, comme le Tunicier *Ascidia mentula* Müll., soit parce qu'ils présentaient une disposition spéciale aux réactions tumorales comme l'annélide polychète *Nereis diversicolor*.

Dans un premier groupe d'expériences, j'ai inoculé des substances chimiques mélangées en parties égales à des extraits organiques différents. Les substances employées furent des solutions à 0,1 p. 100 dans l'eau distillée, d'arséniate de soude et d'indol, et de l'eau distillée, chargée à l'autoclave de coaltar. Les extraits organiques furent, soit de la pulpe d'embryon de poulet de huit jours, soit un lysat de sang et d'œufs de *Nereis diversicolor* prélevés aseptiquement par ponction de la cavité générale (extrait homologue), soit un broyat d'œufs de l'Oursin *Paracentrotus lividus* Lk. (prélevés aussi aseptiquement que possible) ou du décapode *Maia squinado* (non aseptique). Le temps de contact des extraits et des substances chimiques avant les inoculations fut de quinze heures environ. Le tableau suivant résume ces diverses expériences :

ANIMAUX INOCULÉS	EXTRAITS ORGANIQUES	SUBSTANCES chimiques
2 <i>Ascidia mentula</i> .	Broyat d'œufs de <i>Maia squinado</i> .	Arsenic.
2 <i>Ascidia mentula</i> .	Broyat d'œufs de <i>Maia squinado</i> .	Indol.
2 <i>Ascidia mentula</i> .	Broyat d'œufs de <i>Maia squinado</i> .	Coaltar.
1 <i>Ascidia mentula</i> .	Broyat d'œufs de <i>Maia squinado</i> .	Coaltar.
4 <i>Nereis diversicolor</i> .	Pulpe d'embryons de Poulet.	Arsenic.
4 <i>Nereis diversicolor</i> .	Pulpe d'embryons de Poulet.	Indol.
3 <i>Nereis diversicolor</i> .	Pulpe d'embryons de Poulet.	Coaltar.
4 <i>Nereis diversicolor</i> .	Broyat d'oocytes de <i>Paracentrotus lividus</i> .	Arsenic.
4 <i>Nereis diversicolor</i> .	Broyat d'oocytes de <i>Paracentrotus lividus</i> .	Indol.
4 <i>Nereis diversicolor</i> .	Broyat d'oocytes de <i>Paracentrotus lividus</i> .	Coaltar.
9 <i>Nereis diversicolor</i> .	Lysat de sang et d'œufs de <i>Nereis diversicolor</i> .	Arsenic.

La technique des inoculations fut pour les Ascidies : 1° deux injections traçantes dans la tunique entre les deux siphons ; 2° une injection de 0 c. c. 5 en pleine tunique vers l'extrémité postérieure droite, du côté inférieur ; pour les annélides une injection de 0 c. c. 1 à 0 c. c. 3 dans la cavité générale, au niveau de la face dorsale de l'hémisegment droit situé à 1 centimètre de la tête environ.

Dans un deuxième groupe d'expériences, j'ai inoculé des émulsions épaisses, dans le liquide de Tyrode, de culture sur gélose de *Bacterium tumefaciens* très virulent (1) à :

1° 6 *Ascidia mentula* (0 c. c. 25) à l'endroit de la deuxième injection ;

2° 8 *Nereis diversicolor* normales à l'endroit décrit précédemment ;

3° 7 *Nereis diversicolor* au voisinage immédiat de petits granulomes, dus aux oocytes dégénérés ;

4° 4 *Nereis diversicolor* au voisinage immédiat de granulomes évolués dus aux oocytes dégénérés ;

5° Des séries de Géphyriens *Sipunculus nudus* Lin. et *Phascolosoma vulgare* de Blainv. dans le sang, en pleine cavité générale, réalisant des passages *in vivo*.

Les divers animaux inoculés furent observés dans des conditions convenables d'élevage. Je signalerai seulement ici que les Annélides furent parfaitement conservés grâce à la technique que j'ai employée précédemment (1930 a).

Je décrirai les résultats obtenus d'abord avec les substances cancérigènes, puis avec le *Bacterium tumefaciens*. J'essaierai ensuite de dégager la signification générale de ces résultats.

III. — INOCULATION DE SUBSTANCES

A PROPRIÉTÉS CANCÉRIGÈNES.

1° *Ascidia mentula* Müll.

Les injections sont dans l'ensemble très toxiques. Sur les 6 Ascidies inoculées avec le broyat d'œufs de *Maia squinado* mélangé aux solutions d'arsenic, d'indol et de coaltar, 5 meurent

(1) Cette souche de *Bacterium tumefaciens* m'a été donnée par M. Magrou, de l'Institut Pasteur, que je remercie de son obligeance.

entre quatre et neuf jours après les injections, de même qu'un témoin ayant reçu du broyat seul.

Une Ascidie, inoculée de broyat-indol, morte le septième jour, présente cependant une réaction appréciable. La deuxième injection, dans la partie postérieure de la tunique, laisse une petite poche de nécrose bordée d'un bourrelet réactionnel verdâtre formé par de la substance dégénérée provenant de la tunique et par un afflux léger de cellules vacuolaires et de lymphocytes. L'unique Ascidie survivante, inoculée de broyat-coaltar, est sacrifiée le neuvième jour, elle présente seulement, au niveau de la deuxième injection, une traînée noirâtre, reste du mélange inoculé en voie de résorption, bordée d'une zone de tunique dégénérée et très légèrement infiltrée. Dans les deux cas, les lacunes sanguines voisines sont d'un diamètre considérable et sont très riches en cellules pétaloïdes uniformément remplies de leur pigment ocre, ce qui correspond à un processus d'élimination.

Il résulte de cette série d'expériences que la tunique d'*Ascidia mentula* réagit très peu localement aux injections de substances que l'on supposait devoir déterminer une multiplication cellulaire intense. Sur 6 exemplaires, 4 résorbent en moins de neuf jours les produits inoculés sans qu'il en reste trace, mais meurent d'intoxication. Les 2 autres ne font *in situ* que des réactions inflammatoires banales.

2° *Nereis diversicolor* O. F. Müll.

A. INOCULATION D'EXTRAITS ORGANIQUES HÉTÉROLOGUES. — 24 *Nereis*, réparties en deux lots principaux, sont inoculées avec les produits chimiques désignés, mélangés soit à la pulpe d'embryons de poulet, soit au broyat d'oocytes de l'oursin *Paracentrotus lividus*, comme il a été dit. Après vingt-neuf jours d'observation, il reste 15 *Nereis* en parfait état ayant complètement résisté au traitement.

Un seul exemplaire, inoculé avec le mélange pulpe embryonnaire de poulet-arsenic, fait au point d'inoculation, entre deux parapodes, un petit nodule de la taille d'une tête d'épingle, remarqué le vingt-cinquième jour. Celui-ci grossit légèrement les jours suivants puis reste stationnaire. L'analyse histologique

montre, d'une part, une zone à oocytes dégénérés, provoquant une réaction lympho-fibroblastique semblable à celle qui fut étudiée précédemment, et, d'autre part, une zone à dégénérats plus ou moins infiltrés représentant les restes de la pulpe embryonnaire injectée. Il n'y a pas de réaction importante du tissu mésenchymateux réticulé. Il est vraisemblable que l'appel leucocytaire déterminé par la pulpe embryonnaire n'a fait qu'accélérer la dégénérescence des oocytes et de ce fait la réaction fibroblastique, d'où la formation du nodule.

B. INOCULATION D'EXTRAIT ORGANIQUE HOMOLOGUE. — 9 *Nereis* sont inoculées avec un lysat, dans la solution d'arséniate de soude à 0,1 p. 100 d'oocytes et d'éléments sanguins de *Nereis*. 8 ne font pas de réactions tumorales.

Mais une autre porte, au point d'inoculation, dès le deuxième jour, un petit nodule qui grossit et atteint finalement la taille de deux têtes d'épingle. Cette *Nereis* meurt un mois après. L'analyse histologique montre que la pulpe inoculée a provoqué sur place un appel de leucocytes et de linocytes. Il y a phagocytose du broyat que l'on retrouve sous forme d'amas dégénérés. De plus, ce nodule, ouvert secondairement, est infecté de bactéries diverses; or, malgré cela, la réaction inflammatoire n'intéresse pas le tissu mésenchymateux réticulé.

Ces inoculations ne provoquent donc, chez *Nereis diversicolor* aussi, que des réactions inflammatoires simples. Notons toutefois que le mélange d'extrait organique homologue et d'arsenic déclenche à lui seul un processus lymphogénétique qui se rapproche de celui que j'ai décrit antérieurement et qui est produit normalement ou artificiellement par les oocytes en dégénérescence.

IV. — INOCULATION DE *Bacterium tumefaciens* Sm. et Town.

1° *Ascidia mentula*.

Les 6 Ascidies inoculées survivent. Deux d'entre elles, sacrifiées le quinzième jour, ne présentent plus trace de l'injection. Les 4 autres, sacrifiées les quatrième, sixième et

quinzième jours, ont, à l'endroit de l'inoculation, des réactions inflammatoires importantes, dont l'étude histologique permet de reconstituer l'évolution.

Macroscopiquement, dès le quatrième jour, on observe chez l'Ascidie 1 une traînée blanchâtre révélant l'inoculation, entourée d'une zone réactionnelle encore peu développée, tandis que l'Ascidie 2 a déjà une traînée vert brun, et une poche de nécrose sphérique de 0 cent. 5 de diamètre, tapissée d'une sorte de membrane brunâtre. Sous cette poche, la tunique comprend une zone décolorée. Les phénomènes sont analogues et paraissent un peu plus importants le sixième jour. L'Ascidie 3 a son extrémité postérieure complètement décolorée. La place de l'inoculation est marquée par une traînée nécrotique brunâtre de 0 cent. 5 de long sur 0 cm. 2 à 0 cent. 3 d'épaisseur. Mais ces réactions locales, qui peuvent être plus considérables encore et persister plus ou moins, sont en réalité éphémères. Ainsi, l'Ascidie 4 fait une réaction beaucoup plus importante que les précédentes. Celle-ci augmente jusqu'au dixième jour, puis entre progressivement en régression. Le quinzième jour, on trouve une traînée qui va de l'orifice d'inoculation à une région centrale verdâtre de 1 centimètre de long sur 0 cent. 3 de large, entourée d'une gaine orangée.

L'étude histologique révèle des phénomènes bien différents de ceux réalisés par inoculation de substances à propriétés cancérigènes. Les divers résultats sont concordants, il paraît plus clair d'en faire un exposé général en les groupant par zones réactionnelles. Nous étudierons d'abord la tunique et ses réactions inflammatoires, ensuite les bords de la cavité nécrotique, puis le contenu de celle-ci.

A. — La portion de la tunique qui entoure la cavité nécrotique est le siège d'une infiltration cellulaire intense, qui permet de suivre certains phénomènes histo-physiologiques.

Dans un premier stade, cette tunique, d'habitude extrêmement pauvre en cellules, est envahie par une quantité assez considérable de petits lymphocytes très chromophiles, comme le représente la figure 1 au faible grossissement (voir aussi fig. 3). Les cavités sanguines sont riches en cellules pigmentaires. Mais cette infiltration peut être beaucoup plus intense. La zone considérée est alors presque complètement occupée

par une quantité de lymphocytes, de cellules mésenchymateuses fusiformes ou étoilées, et surtout de cellules vacuolaires et de cellules pigmentaires pétaloïdes. L'abondance de ces éléments met en évidence ce fait que ce sont les cellules vacuolaires ayant envahi la tunique qui se transforment sur

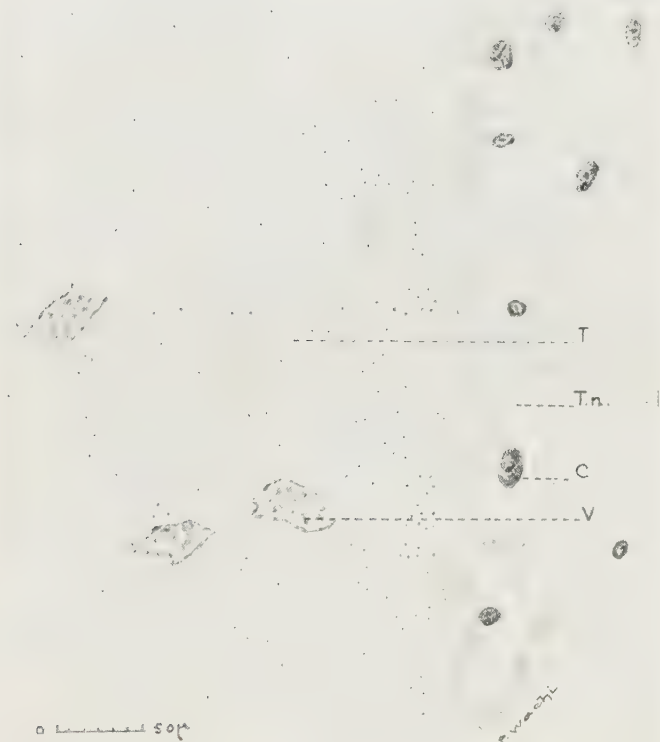


FIG. 1. — Réaction de la tunique d'*Ascidia mentula* inoculée de *Bact. tumefaciens*. Infiltration de petits lymphocytes dans la tunique T. Cellules pigmentaires pétaloïdes dans les cavités sanguines V. Cellules géantes C, à *Bact. tumefaciens*, au bord de la tunique nécrosée Tn.

Fix. Bouin. Color. Thionine phéniquée.

place, en dehors des lacunes sanguines, en cellules pigmentaires. Les préparations colorées à la thionine (fig. 2) sont à cet égard très démonstratives. Les petites cellules vacuolaires de 4 μ environ (fig. 2, A), colorées en bleu, phagocytent les

produits de dégénérescence de la tunique. Ce sont ensuite des cellules plus grandes colorées en vert (fig. 2, B) à noyau central, et qui évoluent déjà vers la forme caractéristique des cellules pigmentaires. On observe alors des stades pétaloïdes de $7\ \mu$ environ qui sont comme des agrégats de quelques vésicules vertes autour d'un noyau (fig. 2, C). La transformation de la substance de ces vésicules en pigment ocre aboutit à la formation de la cellule pigmentaire, de 10 à $12\ \mu$ avec ses pétales uniformément colorés et en général triangulaires (fig. 2, D).

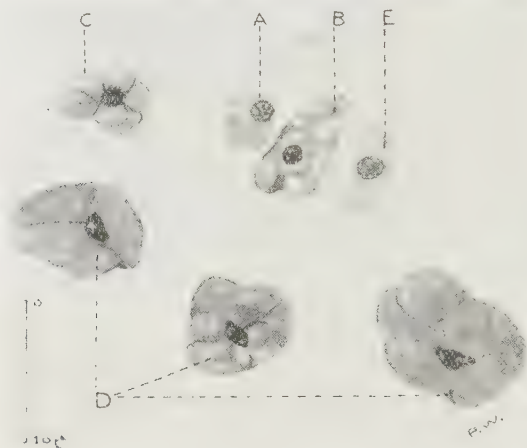


FIG. 2. — Réaction de la tunique d'*Ascidia mentula* inoculée de *Bact. tumefaciens*. Transformation des cellules vacuolaires A (bleues) en cellules bourrées de dégénérats B et C (vertes), puis en cellules pigmentaires pétaloïdes D (ocres). E Cellule mésenchymateuse (bleue).

Fix. Bouin. Color. Thionine phéniquée.

Les cellules vacuolaires peuvent donc se transformer dans la tunique en cellules excrétrices et servir à l'élimination des dégénérats. Ce processus n'est pas sans rappeler leur transformation au niveau du rein en vésicules rénales excrétrices comme Azéma, puis Turchini et Harent (1926) l'ont observé.

Un autre point sur l'importance duquel nous reviendrons est l'évolution dans cette zone du *Bact. tumefaciens*. On le voit, en dehors de toute action phagocytaire, en pleine tunique, subir une transformation spéciale (fig. 3). Il est réduit, d'une façon

très générale en cocci, puis en grains de plus en plus petits allant jusqu'au seuil de la visibilité.

B. — Les bords de la cavité nécrotique sont d'abord seulement

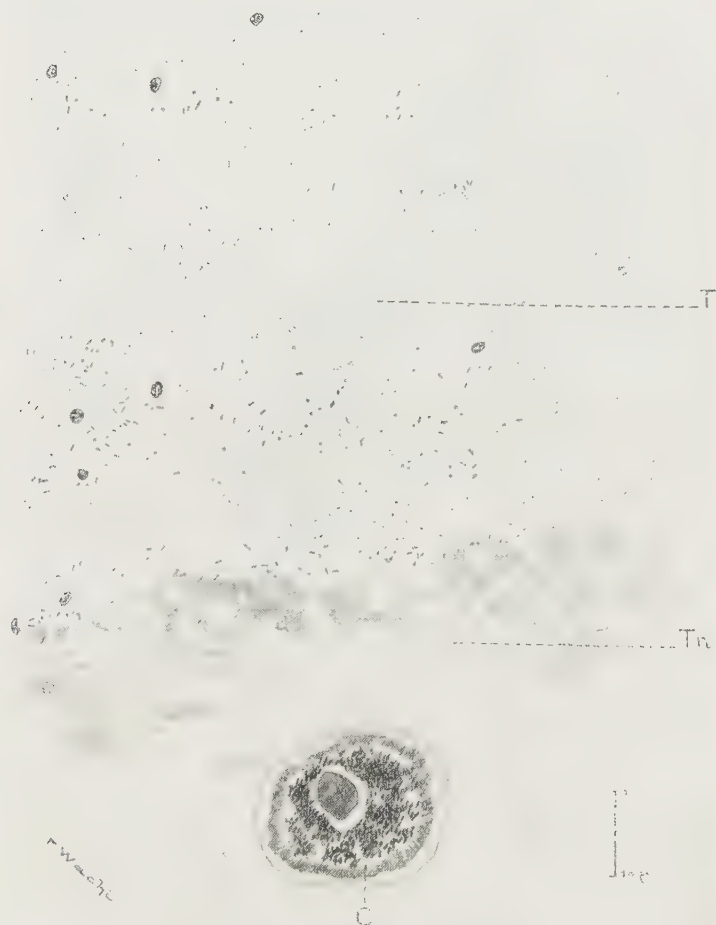


FIG. 3. — Réaction de la tunique d'*Ascidia mentula* inoculée de *Bact. tumefaciens*. La tunique T, infiltrée de lymphocytes, est envahie par le *Bact. tumefaciens* qui subit la transformation granulaire. Tn. tunique nécrosée, C. cellules géantes à noyau pycnotique, bourrées de *Bact. tumefaciens*.
Fix. Bouin. Color. Thionine phéniquée.

limités par la substance dégénérée provenant de la tunique, colorée en vert par la thionine (fig. 1 et 3). Mais ils sont bientôt

remaniés par les cellules mésenchymateuses étoilées et fusiformes qui affluent et se multiplient activement. Celles-ci se regroupent et s'organisent alors en bourgeons importants (fig. 4) dirigés vers la cavité. Ces bourgeons ne contiennent que de rares cellules pigmentaires. On observe aussi que les cellules

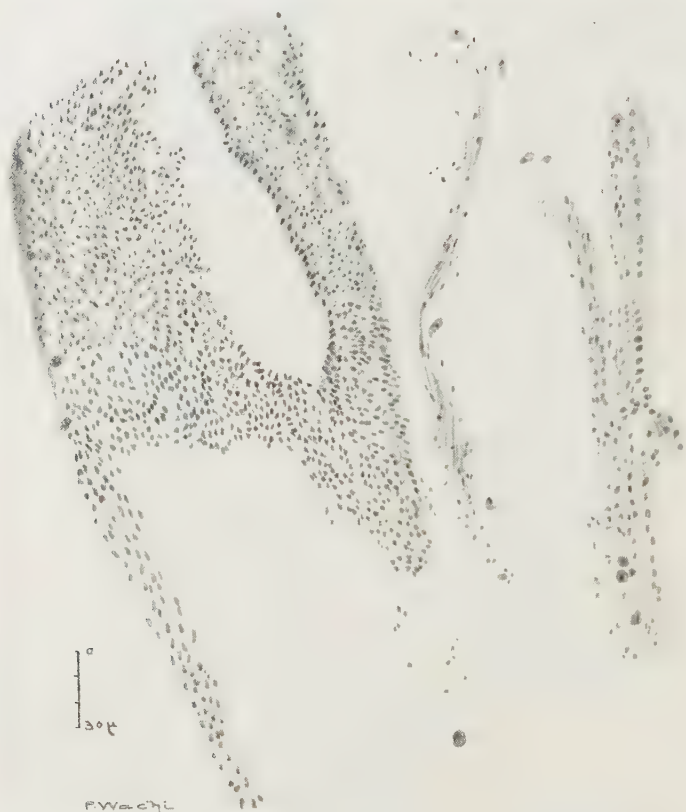


FIG. 4. — Réaction de la tunique d'*Ascidia mentula* inoculée de *Bact. tumefaciens*. Bourgeon formé de cellules mésenchymateuses au bord de la cavité nécrotique. On distingue quelques cellules pigmentaires.
Fix. Bouin. Color. Glycémalum-Eosine.

mésenchymateuses peuvent parfois s'orienter concentriquement autour de foyers inflammatoires, réalisant des sortes de tubercules.

C. — Dans la cavité nécrotique, près des parois, les cellules

vacuolaires subissent une autre évolution intéressante. Elles phagocytent en masse le *Bact. tumefaciens* (fig. 5) sans que leur activité phagocytaire se ralentisse tout d'abord, aussi augmentent-elles rapidement de volume. La figure 5 B montre un stade d'évolution, sous forme d'une grande cellule de près de $15\ \mu$ à noyau pycnotique, dont le cytoplasme est creusé de vacuoles. Les Bacilles sont généralement agglutinés en paquets au sein de ces vacuoles, d'autres sont en train d'être phagocytés. Notons l'apparition à la périphérie de la cellule d'une membrane mince et large, irrégulière, qui a l'aspect d'une membrane ondulante. La figure 3 C représente un

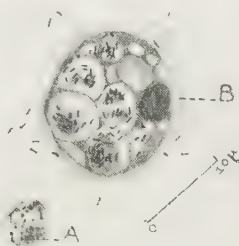


FIG. 5 — Réaction de la tunique d'*Ascidia mentula* inoculée de *Bact. tumefaciens*. Phagocytose du *Bact. tumefaciens* par une cellule vacuolaire A., et évolution d'une telle cellule en cellule géante B., à noyau pycnotique et à membrane ondulante.

Fix. Bouin. Color. Thionine phéniquée.

aspect terminal de cette évolution. Nous avons affaire à une cellule géante arrondie, de près de $25\ \mu$, à noyau entièrement pycnotique. Le cytoplasme, presque complètement détruit, n'existe plus que sous forme d'une couronne d'aspect radié, contre la membrane cellulaire. Tout l'espace entre cette couronne et le noyau, qui est cependant nettement isolé, est rempli de *Bact. tumefaciens* non dégénérés. Notons la persistance de la membrane ondulante.

Les réactions inflammatoires déterminées dans la tunique d'*Ascidia mentula* par inoculation de *Bact. tumefaciens* sont donc beaucoup plus considérables que celles que nous avons obtenues avec un extrait organique additionné d'arsenic, d'indol ou de coaltar. On déclenche une infiltration cellulaire intense,

avec transformation sur place des cellules vacuolaires en cellules pigmentaires d'élimination, tandis que les cellules mésenchymateuses, qui prolifèrent intensément, s'organisent en bourgeons réactionnels. De plus, le *Bact. tumefaciens* subit en pleine tunique une transformation en granules au seuil de la visibilité, mais on le trouve sous forme de Bacilles dans certaines cellules vacuolaires transformées en cellules géantes. Cependant ces réactions inflammatoires, d'abord si marquées, régressent progressivement d'elles-mêmes.

2° *Nereis diversicolor*.

19 *Nereis*, réparties en 3 lots, sont inoculées avec le *Bact. tumefaciens*. Nous nous occuperons séparément de chacun de ces lots, savoir ; A des *Nereis* indemnes, B et C des *Nereis* présentant, à divers stades d'évolution, les granulomes à oocytes dégénérés que j'ai décrits, dans l'espoir d'observer une accélération ou une transformation du processus réactionnel.

A. *Nereis diversicolor* NORMALES. — Sur 8 *Nereis*, 3 seulement résistent encore à l'inoculation après onze jours. Les autres meurent plus ou moins rapidement d'infection générale à *Bact. tumefaciens*. Elles font, de plus, un nodule inflammatoire au point d'inoculation. Deux fois, un autre nodule apparaît non loin du premier. Ceux-ci se développent rapidement parfois dès le lendemain de l'inoculation, ils sont blanchâtres et peuvent atteindre la taille de deux têtes d'épingle. Les frottis montrent le *Bact. tumefaciens* en abondance à leur niveau sous sa forme de Bacille Gram-négatif, très caractéristique. De plus, les tissus entrent fréquemment en mortification à partir de la région inoculée ; cette mortification peut être progressive ; on retrouve aussi le *Bact. tumefaciens* dans ces tissus, mais au milieu d'une riche flore d'invasion.

B. *Nereis diversicolor* PORTANT DE PETITS GRANULOMES A OOCYTES DÉGÉNÉRÉS. — 7 de ces annélides sont inoculés au voisinage immédiat de leur granulome, en général minuscule.

Au bout de onze jours, trois exemplaires n'ont pas présenté de réaction. Les autres font une infection générale qui les tue

plus ou moins rapidement entre huit et vingt-deux jours; ils subissent d'autre part une évolution de leur petit granulome qui est infecté par le *Bact. tumefaciens* ou font des nodules inflammatoires non loin de là.

Les granulomes atteignent souvent la taille de deux têtes d'épingle mais ils ne sont envahis que par une onde nouvelle de leucocytes et de linocytes. Le liquide cœlomique contient aussi le *Bact. tumefaciens*, ce qui montre la généralisation de l'infection qui détermine souvent, ici encore, un processus de mortification progressive des tissus.

C. Nereis diversicolor PORTANT DE GROS GRANULOMES A OOCYTES DÉGÉNÉRÉS. — 4 *Nereis* sont inoculées au voisinage immédiat de leur granulome. La *Nereis* 1 en porte un de la taille de la moitié d'un petit pois; la *Nereis* 2, un autre plus petit; enfin les *Nereis* 3 et 4 en ont un de la taille d'une grosse tête d'épingle.

Les deux dernières ne présentent pas d'évolution spéciale de leur granulome qui est relativement peu développé, et entrent par conséquent dans la dernière catégorie étudiée. La *Nereis* 4 meurt le seizième jour; des frottis de sa néoformation montrent quelques petits groupes de *Bact. tumefaciens*. La *Nereis* 3 est sacrifiée le vingt-deuxième jour, étant atteinte de mortification progressive de ses tissus. Les frottis de sa tumeur mettent en évidence de rares *Bact. tumefaciens* et les cellules réactionnelles habituelles. Par contre, l'évolution des granulomes des *Nereis* 1 et 2 est particulièrement intéressante et mérite d'être décrite en détail.

La *Nereis* 1 présente dès le lendemain de l'inoculation un petit nodule néoformé à la base d'un parapode opposé à la grosse tumeur. Le deuxième jour, ce nodule est hémorragique; des frottis y montrent le *Bact. tumefaciens*, mais assez peu abondant. D'autre part, 3 bourgeons nouveaux ont poussé sur la grosse tumeur, à la limite des tissus normaux; il y en a 2 du côté dorsal et 1 du côté ventral; ils sont hémorragiques également. Comme la *Nereis* paraît mourante, elle est sacrifiée, et la tumeur fixée dans le liquide de Bouin.

Après l'inoculation, la tumeur de la *Nereis* 2 entre brusquement dans une phase de croissance importante et continue. Deux jours plus tard, elle englobe 2 parapodes droits vers le

milieu du corps, avec propagation aux tissus sains, du vaisseau ventral au vaisseau dorsal. Quatre jours après, elle englobe complètement les 2 parapodes et les 2 hémisegments. Une autre néoformation a poussé rapidement à la base d'un parapode gauche opposé, légèrement antérieur; elle est maintenant du volume d'une tête d'épingle. *Cependant ce processus d'extension*



FIG. 6. — Tumeur de *Nereis diversicolor* 1 inoculée de *Bact. tumefaciens*. On voit le granulome primitif à droite, de haut en bas, avec ses oocytes dégénérés. Au centre, début de la prolifération du tissu réticulé qui détruit la masse musculaire supérieure droite.

Fix. Bouin. Color. Hématoxyline au fer-Eosine. Photomicrographie.

ne cesse de prendre de l'importance tandis que la Nereis est de plus en plus atteinte dans sa vitalité. Elle remue à peine le huitième jour, la grosse tumeur est dense, légèrement verdâtre, de la taille de la moitié d'un petit pois, la petite tumeur est de la taille d'une grosse tête d'épingle. Le neuvième jour, la *Nereis*

paraît agonisante, elle est sacrifiée. La grosse tumeur occupe 4 parapodes et porte un nouveau bourgeon en arrière et à gauche. La petite tumeur englobe 2 parapodes. Ces deux pièces sont fixées dans le formol à 10 p. 100 dans de l'eau de mer.

D'autre part, dès le huitième jour divers nodules infectieux se sont formés sur plusieurs parapodes et sur plusieurs segments. Des frottis montrent là le *Bact. tumefaciens*, surtout dans ses formes courtes qui sont très nombreuses. Il y a d'autre part une abondance particulière de leucocytes et de linocytes, témoins d'une lymphogénèse importante. Enfin, le liquide de la cavité générale montre encore en abondance le *Bact. tumefaciens* et de très nombreuses cellules lymphoïdes et linocytaires. Il y a donc généralisation concomitante de l'infection et de la lymphogénèse.

Nous nous occuperons maintenant de l'étude histo-bactériologique de ces trois tumeurs, fixées à des stades différents. Les résultats sont concordants, et indiquent l'évolution du processus.

La figure 6 représente une coupe transversale à un faible grossissement de la tumeur de *Nereis* 1. C'est une masse volumineuse qui occupe toute la moitié du corps et qui a réuni en un seul bloc le parapode et le segment. Quoique cette tumeur soit encore tout au début de son évolution, elle est déjà bien différente des granulomes dus à la dégénérescence des oocytes (voir mon mémoire 1930 a, fig. 6 et 7). L'ancien granulome, facilement reconnaissable à ses oocytes dégénérés et à la réaction lympho-fibroblastique que ceux-ci ont déclanchée, occupe tout le bord supérieur et le bord droit. Mais tout l'espace compris entre cette zone et le tube digestif, à gauche, est occupé par du tissu mésenchymateux néoformé. On voit que ce tissu a pris des proportions considérables et qu'il est en train de désorganiser et de détruire le muscle longitudinal supérieur droit dont la basale est rompue. Ce muscle, au lieu d'être enroulé sur lui-même, est ouvert et appliqué contre le tube digestif; ses lames sont dissociées et plus ou moins infiltrées. De même, en bas, les muscles transversaux de l'appareil aciculaire, qui est détruit, sont rompus et désorganisés.

La figure 7 nous montre, au faible grossissement, l'évolution du réticulum mésenchymateux. Il s'agit d'une coupe transver-

sale passant non loin du centre de la tumeur évoluée de *Nereis* 2. Ce parenchyme s'est tellement développé, qu'il occupe toute la tumeur : il a détruit toutes les formations normales et s'est substitué à elles : muscle supérieur, muscle inférieur, muscles des soies et des acicules. C'est un tissu à orientation multiple, désordonnée, au sein duquel on voit encore quelques

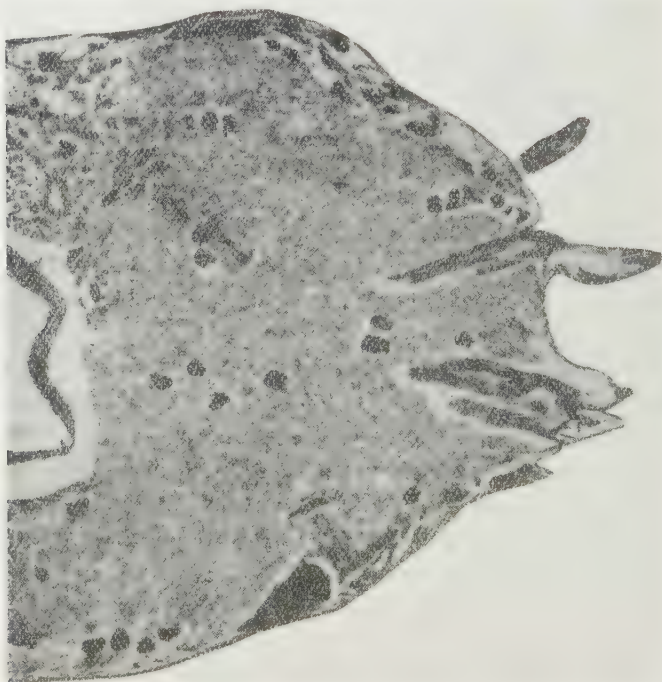


FIG. 7. — Tumeur de *Nereis diversicolor* 2 inoculée de *Bact. tumefaciens*. Coupe transversale. Toute la moitié du corps est envahie par le tissu mésenchymateux. Parapode et segment sont réunis en un seul bloc; destruction des muscles longitudinaux et de l'appareil aciculaire. Quelques oocytes dégénérés subsistent dans ce tissu tumoral à orientation désordonnée.

Fix. Formol 10 p. 100 dans l'eau de mer. Color. Hématoxyline au fer-Eosine. Photomicrographie.

oocytes dégénérés, très sidérophiles. On ne trouve plus ces oocytes au centre même de la tumeur. A noter que le tube digestif est là, très dégénéré.

Il convient maintenant d'analyser les détails cytologiques de ce processus. Cette étude montre que nous avons affaire à deux phénomènes concomitants, mais nettement séparables : lymphogénèse et infiltration inflammatoire d'une part, croissance atypique du mésenchyme réticulé d'autre part. Nous nous occupons séparément de ces deux catégories de faits.

L'examen de la tumeur 1 révèle déjà une infiltration lym-

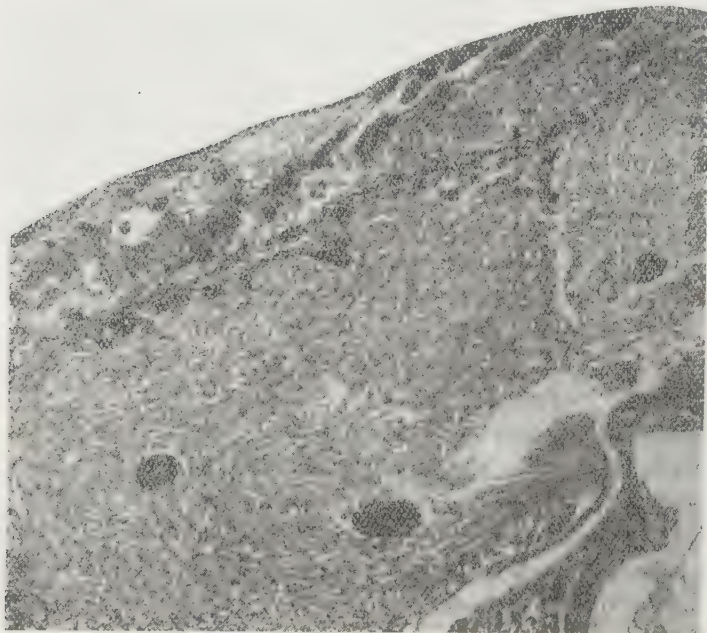


FIG. 8. — Tumeur de *Nereis diversicolor* 2 inoculée de *Bact. tumefaciens*. Bord d'une coupe transversale montrant à la fois les deux processus réactionnels : 1° le tissu tumoral qui a infiltré et détruit le muscle, jusqu'à la basale musculaire qui est partiellement respectée; 2° l'accumulation intense de leucocytes et de linocytes, entre cette basale et les léguments. Fix. Formol 10 p. 100 dans l'eau de mer. Color. Hématoxyline au fer-Eosine. Photomicrographie.

phoïde dans les mailles du mésenchyme tumoral. Il s'agit d'une deuxième onde de lymphogénèse provoquée par le *Bact. tumefaciens* (la première étant celle déterminée par les oocytes en dégénérescence). C'est une sorte de surréaction cytologique, mais plus importante. Cette infiltration est beaucoup plus

considérable dans la tumeur 2, où elle s'étend même aux tissus normaux. On rencontre des îlots de lymphogénèse, analogues à ceux que j'ai décrits antérieurement, mais à évolution accélérée; on peut remarquer, en effet, que les cellules de la périphérie de ces îlots sont rapidement différenciées. Il s'agit des mêmes cellules lymphoïdes que celles dont j'ai suivi la filiation (1930 *a*, p. 298-300. fig. 15 et 16) : leucocytes hyalins, surtout au stade I, granulocytes, quelques éléocytes à graisse dissoute ici et linocytes. Cependant, lors de l'évolution de ces tumeurs, les deux processus : lymphogénèse et prolifération conjonctive, se dissocient nettement. La figure 8 est une coupe passant près d'un des bords de la tumeur 2; elle illustre bien ce fait. La zone centrale est uniquement formée de parenchyme tumoral, qui a détruit et remplacé le muscle jusqu'à la basale, très partiellement respectée. Mais la zone périphérique située entre cette basale et les téguments et qui correspond à ce qui reste de l'ancien granulome est infiltrée par une quantité considérable de cellules lymphoïdes. On y voit surtout une abondance extraordinaire de linocytes, à linome épais, très sidérophile. Ces cellules ne tendent pas, cette fois, à l'organisation fibroblastique.

L'évolution cytologique du tissu mésenchymateux réticulé est surtout intéressante. Normalement, ce tissu (tissu connectif adipo-sexuel de Clarapède, 1868; réticulum cellulaire de A. Prenant, 1929) est, comme je l'ai précédemment décrit (1930 *a*), « un parenchyme très peu serré, avec des noyaux assez peu nombreux, ovalaires, pâles, peu riches en chromatine ». Il est, en général, chargé d'inclusions graisseuses. Il est plus ou moins développé selon l'état sexuel des *Nereis*, et plus abondant lors de la sarcolyse selon A. Prenant. Je l'avais quelquefois trouvé assez important dans les granulomes à oocytes, mais il ne prend aucune part aux réactions provoquées par l'inoculation de substances cancérigènes, ou lors de l'infection par des Bactéries banales. Il en est tout autrement dans les trois tumeurs étudiées ici.

La trame cellulaire primitive, en général polyédrique, est profondément modifiée. Les cellules s'individualisent alors que leurs limites sont d'habitude imprécises. Elles tendent à s'arrondir, puis à se libérer. Enfin, elles prolifèrent activement.

Cette transformation est très nette et évidente, particulièrement dans la tumeur 1 au début, où ce tissu est encore souvent sub-normal. Mais il est bientôt constitué par des cellules arrondies ou ovales, à protoplasma généralement en anneaux plus ou

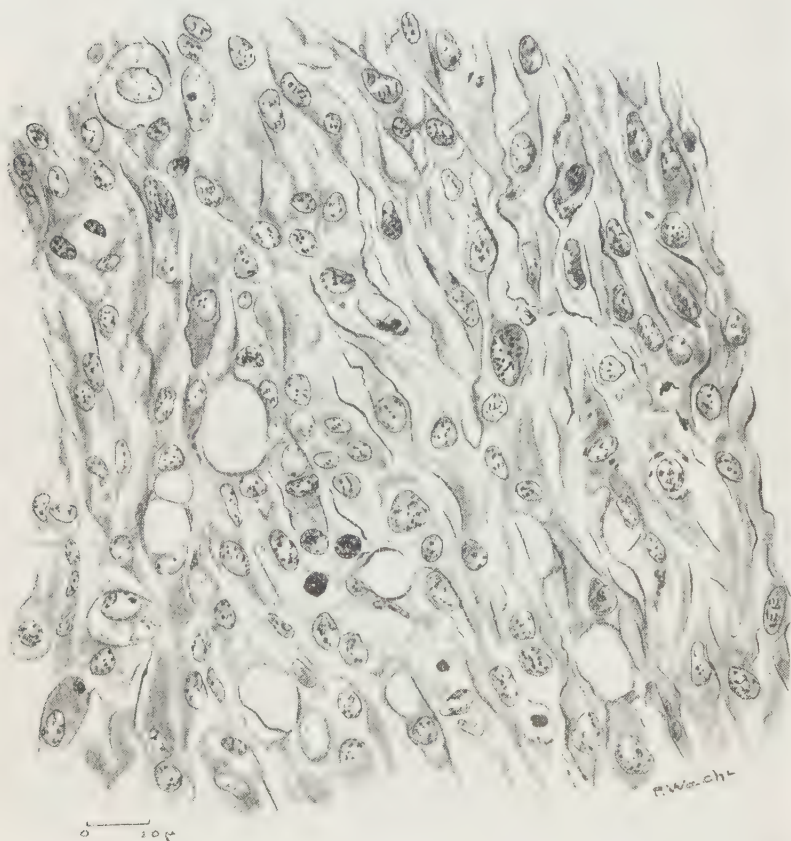


FIG. 9. — Tumeur de *Nereis diversicolor* 1 inoculée de *Bact. tumefaciens*. Invasion de l'ancien granulome lympho-fibroblastique avec ses fibrilles d'origine linocytaire, par les cellules tumorales dont certaines ont conservé leur forme en anneau. Observer les noyaux géants.

Fix. Bouin. Color. Hématoxyline au fer-Eosine.

moins épais (voir fig. 13 et 14). Le noyau arrondi est encore le plus souvent périphérique, il est unique. Ce sont ces cellules qui envahissent et détruisent les diverses formations avec les-

quelles elles entrent en rapport. Elles infiltrèrent tout d'abord le granulome primitif lympho-fibroblastique provoqué par les

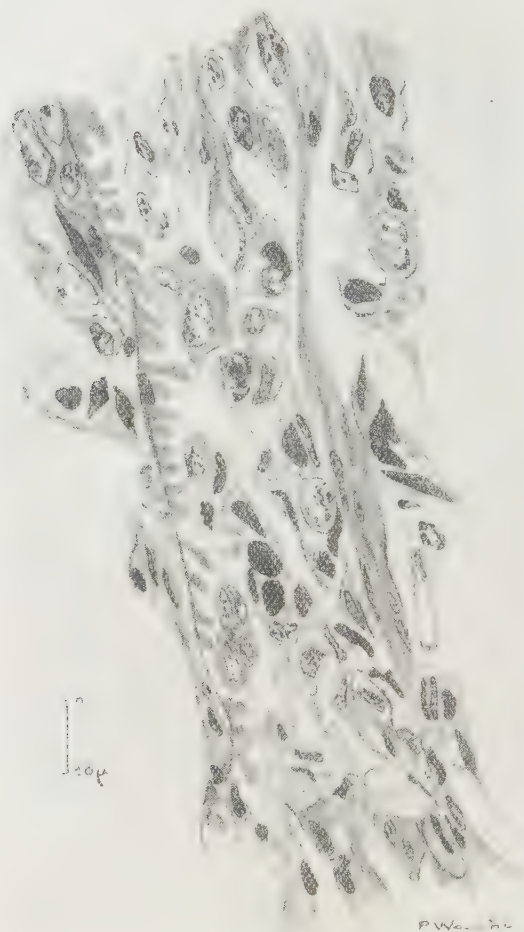


FIG. 10. — Tumeur de *Nereis diversicolor* 2 inoculée de *Bact. tumefaciens*. Infiltration et destruction du muscle (dont on voit la basale à gauche avec quelques lames musculaires dégénérées) par les cellules tumorales, à noyaux géants et à sarcolytes sidérophiles intracytoplasmiques.
Fix. Formol 10 p. 100 dans l'eau de mer. Color. Hématoxyline au fer-Eosine.

oocytes. La figure 9 représente cette progression au sein de

l'ancien tissu réactionnel dont on voit encore très nettement les fibrilles dérivées du linome. Les cellules tumorales, souvent en anneaux, sont parfois étroitement groupées et denses, on observe qu'elles se multiplient activement, par mitose. D'autre part, les noyaux sont fréquemment géants, avec une abondance particulière de caryosomes très sidérophiles. Mais l'activité destructrice de ces cellules se manifeste aussi aux dépens des tissus normaux et spécialement des divers appareils musculaires. Elles forment des boyaux cellulaires qui s'insinuent entre les lamelles des muscles (fig. 10). Celles-ci sont phagocytées; la basale, quelque temps épargnée, cède à son tour et le muscle tout entier est détruit. Finalement, tout le bloc tumoral est constitué par ce tissu mésenchymateux néoformé, sans qu'il subsiste rien des structures normales. Les cellules qui, par endroits, sont encore en anneaux (fig. 11), sont souvent serrées et pleines. Leur noyau est assez fréquemment hypertrophié ou géant, présentant des mitoses atypiques. Elles se transforment par endroits en petites cellules fusiformes (fig. 12), à orientation tourbillonnaire, avec des noyaux également allongés ou géants.

Il convient maintenant de donner quelques détails sur la phagocytose musculaire. Je rappellerai, à ce propos, que le problème de la sarcolyse chez les Néréidiens a été diversement interprété. J'ai noté (1930 a, p. 306) qu'au niveau des granulomes à oocytes, il y a, en général, des phénomènes de myolyse, avec désorganisation des lamelles du type axial, gonflement, acidophilie. Mais il n'y a pas de phagocytose musculaire indiscutable. Je citais de même l'opinion de A. Prenant (1929) qui a trouvé chez *Nereis diversicolor*, comme A. Dehorne (1922), des sarcolytes anucléés, mais qui pense que leur formation par phagocytose est « exceptionnelle et sans importance ». Il en est tout autrement ici où la destruction du muscle s'opère indiscutablement par phagocytose. Les figures 10 et 11 sont très démonstratives à cet égard. Elles montrent que ce sont les cellules tumorales qui, après avoir envahi les muscles, phagocytent leurs lamelles. Une même cellule peut contenir jusqu'à quatre gros sarcolytes intracytoplasmiques. Ce sont des masses irrégulièrement arrondies de 5 à 6 μ de diamètre, ou ovales, ou enfin des fuseaux plus ou moins épais atteignant 10 à 12 μ de

long. Ces sarcolytes sont transformés dans les cellules, en fuseaux de plus en plus minces et courts, finalement en petites boules ou baguettes, probablement digérées en totalité. Remarquons que la myolyse est prononcée au niveau des muscles du parapode opposé non tumoral. Or, il n'y a pas là de phagocytose par les leucocytes. Les lames musculaires dégénérées tombent d'elles-mêmes dans le cœlome, formant des sarcolytes

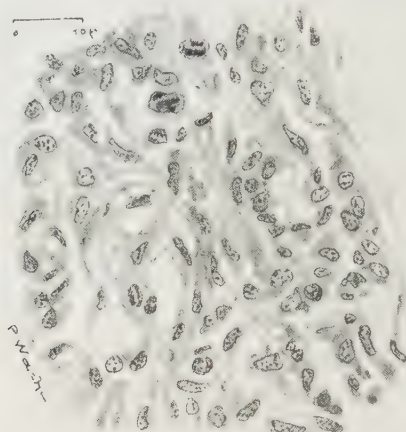


FIG. 11. — Tumeur de *Nereis diversicolor* 2 inoculée de *Bact. tumefaciens*. Tissu tumoral ayant infiltré, détruit et remplacé le muscle. En bas, les cellules ont encore assez nettement leur forme en anneau. Très nombreux sarcolytes sidérophiles, intracytoplasmiques.

Fix. Formol 10 p. 100 dans l'eau de mer. Color. Hématoxyline au fer-Eosine.

anucléés, sidérophiles, qu'il faut du reste savoir distinguer dans certains cas, sur les préparations à la laque ferrique, des linocytes peu différenciés. Le processus de la phagocytose musculaire, par les cellules conjonctives, est donc purement pathologique.

L'étude de ces tumeurs nous donne, d'autre part, des détails importants sur l'évolution du *Bact. tumefaciens*. Les colorations bactériologiques permettent de trouver à la périphérie de la tumeur, au début, quelques amas de cellules qui contiennent ce microbe. Un groupe de ces cellules est représenté par la

figure 13. Le parasite est abondant dans le cytoplasme, mais on peut le trouver, quoique rarement, dans le noyau cellulaire.

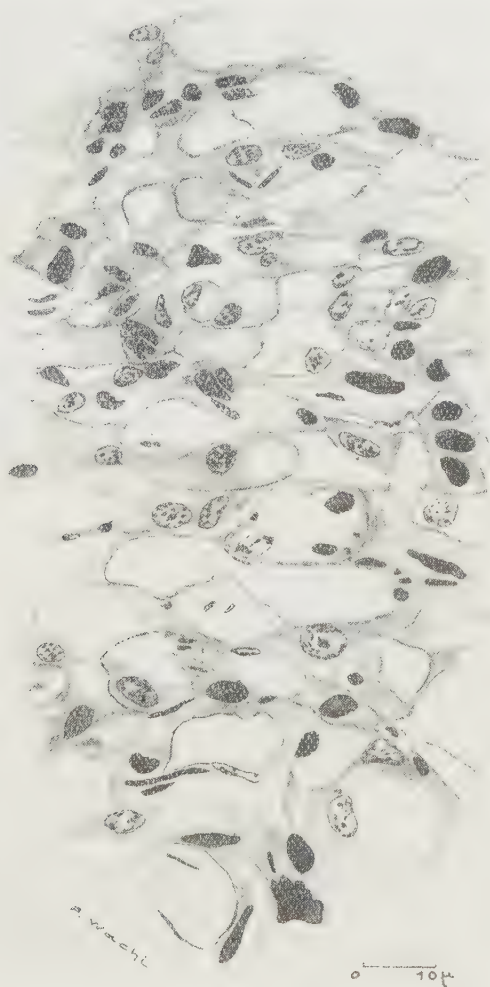


FIG. 12. — Tumeur de *Nereis diversicolor* 2 inoculée de *Bact. tumefaciens*. Evolution du tissu tumoral réticulé en tissu dense à cellules souvent fusiformes, à orientation tourbillonnaire. Noyaux géants en mitose atypique.

Fix. Formol 10 p. 100 dans l'eau de mer. Color. Glycémalum-Eosine.

On peut observer qu'à côté des formes bacillaires existent des

formes arrondies en cocci. Parmi celles-ci, il y en a de très fines, sur lesquelles nous reviendrons, et d'autres plus grosses, souvent irrégulières, qui sont probablement des formes de

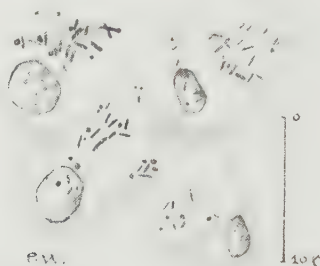


FIG. 13. — Tumeur de *Nereis diversicolor* 1 inoculée de *Bact. tumefaciens*. Groupe de cellules à la périphérie de la tumeur parasitées par le *Bact. tumefaciens*. Quelques microbes dans deux noyaux. Présence de formes bactériennes granulaires.

Fix. Bouin. Color. Thionine phéniquée.



FIG. 14. — Tumeur de *Nereis diversicolor* 2 inoculée de *Bact. tumefaciens*. A. et B. deux cellules tumorales parasitées par le *Bact. tumefaciens* sous sa forme uniquement granulaire. Présence de granules bactériens dans le noyau, contre la membrane nucléaire. La cellule A contient un sarcoyte arrondi; son noyau est dégénéré.

Fix. Formol 10 p. 100 dans l'eau de mer. Color. panoptique de Papanheim.

dégénérescence. Par contre, le parenchyme central de la même tumeur ne contient pas de Bacilles, mais seulement des gra-

nules très petits. Enfin, la tumeur 2 évoluée ne contient plus de Bacilles; certaines cellules, par contre (fig. 14), renferment des granulations différentes des résidus de la phagocytose musculaire et qui sont vraisemblablement issues du *Bact. tumefaciens*. Ces granulations sont dans le cytoplasme, mais elles peuvent exister aussi dans le noyau cellulaire parfois dégénéré, particulièrement contre la membrane nucléaire.

En résumé, le *Bact. tumefaciens* peut provoquer chez *Nereis diversicolor* une infection généralisée qui détermine une lymphogénèse abondante avec formation de petits nodules inflammatoires. Mais dans le tissu lympho-fibroblastique des granulomes à oocytes dégénérés, il semble que ce microbe trouve un terrain de choix. Il déclenche non seulement une lymphogénèse considérable, mais aussi une prolifération atypique du tissu réticulé qui infiltre et détruit tous les tissus voisins. Or, corrélativement, le *Bact. tumefaciens* subit une transformation en granules qui parasitent les cellules tumorales.

3° *Sipunculus nudus* Lin.

Des réactions d'immunisation du Siponcle contre le *Bact. tumefaciens* ont été étudiées par J. Cantacuzène (1928); mais quels sont les phénomènes cytologiques et microbiologiques déterminés par ce microorganisme, au cours d'une infection éventuellement aiguë du liquide cavitare de ce Géphyrien?

J'ai inoculé des Siponcles dans la cavité générale, avec 0 c. c. 5 d'une émulsion de ma souche de *Bact. tumefaciens*, puis j'ai réalisé des passages d'animal à animal, dans l'espoir d'exalter la virulence du microbe. Les examens bactériologiques et hématologiques me permirent chaque fois d'apprécier les résultats. J'essayai ensuite de reproduire les mêmes phénomènes, en infectant *in vitro* du sang stérile de Siponcle.

A. INFECTION EXPÉRIMENTALE *in vivo*. — Les trois premiers Siponcles inoculés sont atteints d'une infection générale progressive et mortelle. Ils agonisent le cinquième jour : ils sont blancs, inertes, ne s'enfoncent plus dans le sable. Ils meurent le sixième jour. Un seul a encore le sang rosé, comme d'habitude; les deux autres ont leur sang complètement décoloré. Le

quatrième jour de l'infection, du sang d'un des Siponcles sert à inoculer un autre Siponcle et ainsi de suite. La durée de l'infection est chaque fois raccourcie, comme si la virulence du *Bact. tumefaciens* était corrélativement augmentée. Au premier passage, la mort survient en quatre jours, au deuxième passage en deux jours, au troisième passage enfin en quinze heures environ. Le sang est alors complètement décoloré, louche, épais.

Le *Bact. tumefaciens* se multiplie rapidement dans le liquide cavitaire; toutefois le deuxième jour, lors des primo-inoculations, les formes bacillaires libres sont encore assez peu nombreuses dans le plasma. Elles manifestent, en effet, dès le début, une affinité particulière pour certaines cellules. Ce cytotropisme est sans rapport avec la phagocytose telle qu'elle peut être effectuée par les leucocytes qui forment, par exemple, des congutinatns bourrés de ce microbe. Toutefois, un phénomène me paraît spécialement digne d'être signalé : c'est le mode d'infection des érythrocytes par le *Bact. tumefaciens*. Celui-ci infecte surtout, d'abord, le noyau de ces cellules, tandis que le cytoplasme est encore indemne; on obtient alors des images semblables à la figure 15, A. Mais le noyau dégénère, il entre en pycnose et en caryorhexis, et les éléments microbiens, dont la morphologie change comme nous le verrons, infectent le cytoplasme qui en est bientôt complètement rempli (Fig. 15, B). Finalement le cytoplasme dégénère à son tour, et l'érythrocyte est lysé. On peut, du reste, constater un processus analogue d'infection du noyau des spermatocytes chez les Siponcles mâles. Le quatrième jour de l'infection, l'érythrolyse est très prononcée. Le *Bact. tumefaciens* continue à proliférer. On le trouve en abondance dans le plasma, à l'état libre. Il y a de plus une multiplication assez importante des leucocytes à fines granulations éosinophiles, tandis que les urnes et les vésicules énigmatiques sont rares. Le sixième jour, la saignée totale des Siponcles en expérience donne un reliquat d'érythrocytes, avec microcytes et macrocytes, ayant résisté à l'infection. Le cytoplasme de ces formes résistantes est souvent dépourvu de *B. tumefaciens*, quoique l'on puisse y trouver parfois des amas de ce microbe. Mais le noyau est généralement infecté, il contient fréquemment en son centre un groupe de *Bact. tumefaciens*

dégénérés (fig. 15, C), alors que des Bacilles normaux sont appliqués en couronne, à l'intérieur de la membrane nucléaire. Les urnes et les vésicules énigmatiques sont, ici encore, rares.

Au cours de cette infection, les érythrocytes sont très fréquemment chargés d'inclusions cytoplasmiques. J'ai pu observer quelques faits, qui paraissent bien en faveur de l'hypothèse d'une fonction excrétrice de ces cellules, comme l'a formulé Guénot. Le cytoplasme contient souvent, tout d'abord, une

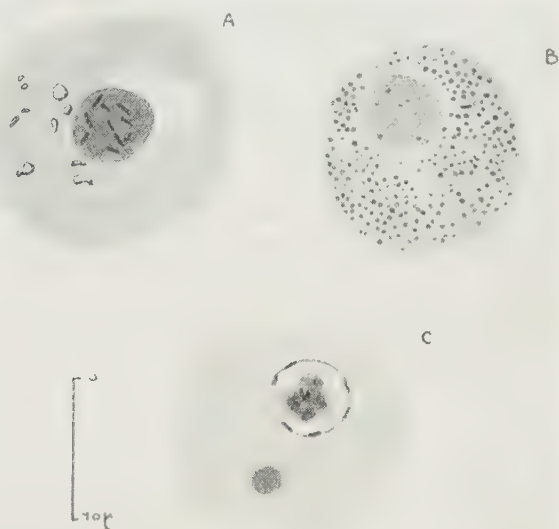


FIG. 15. — Erythrocytes de *Sipunculus nudus* parasités par le *Bact. tumefaciens*. A. début de l'infection nucléaire expérimentale *in vitro*. Cristaux intracytoplasmiques (excrétion). B. deuxième jour de l'infection *in vivo*. Pycnose, invasion du cytoplasme par les formes granulaires. C. Erythrocytes ayant résisté à l'infection *in vivo* (sixième jour). Amas de Bacilles dégénérés au centre du noyau, Bacilles normaux appliqués à l'intérieur de la membrane nucléaire. Inclusion cytoplasmique (corps jaune).

Color. Bleu de méthylène.

inclusion arrondie plus ou moins volumineuse et ocre, sur laquelle J. Cantacuzène a attiré récemment l'attention. Elle est généralement telle quelle après coloration par la méthode de Giemsa, mais est teintée en bleu par le bleu de méthylène. De plus, surtout chez les érythrocytes résistant à l'infection, le cytoplasme contient d'autres inclusions anguleuses (fig. 15, A).

parfois cubiques, réfringentes, très probablement cristallines qui peuvent même être groupées en macles. Ces cristaux sont rejetés et laissent un trou dans le cytoplasme. La confluence des places vides laissées par le rejet des diverses inclusions forme dans la suite les vacuoles plus ou moins persistantes et volumineuses, que l'on trouve généralement dans le cytoplasme des érythrocytes.

Lors des passages *in vivo*, les phénomènes cytologiques sont tout d'abord de même ordre, mais ils aboutissent à une érythrolyse plus rapide. Au troisième passage, le sang est complètement décoloré, louche, épais. Après centrifugation, on obtient un mince culot brun jaunâtre, contenant peu d'hématies intactes, mais il est impossible de produire un agglutinat de leucocytes. Le plasma, au lieu d'être incolore, est blanc jaunâtre, il contient en abondance le *Bact. tumefaciens*. De plus, au cours des passages, les propriétés de ce microbe semblent modifiées. Nous avons vu qu'au début de l'infection les formes bacillaires libres sont assez rares dans le plasma, cependant on peut y observer, de même que dans les amas cellulaires, la présence de formes grêles, de granules et de grains au seuil de la visibilité. Or, cette transformation en granules est très générale, on l'observe au niveau du noyau, puis du cytoplasme (fig. 15, B). Ces granulations paraissent différentes des formes de dégénérescence des amas bactériens, et doivent correspondre plutôt à une évolution qu'à une régression. Par contre, les passages *in vivo* semblent déterminer une adaptation du *Bact. tumefaciens* au Siponcle, adaptation qui se traduit par un accroissement des propriétés septicémiques. On constate que ce microbe se multiplie de plus en plus, dans le plasma, sous forme d'éléments bacillaires très vigoureux, alors qu'il tend à perdre en partie son affinité pour les érythrocytes et spécialement pour leur noyau. Corrélativement, les formes ultra-microbiennes sont rares.

Du plasma de Siponcle au troisième passage fut ensemencé sur gélose pour vérification. J'ai pu obtenir, après plusieurs isolements, un microbe dont les propriétés sont voisines de celles assignées au *Bact. tumefaciens*. C'est un Bacille mobile, Gram négatif, à bouts arrondis, ayant la même morphologie que le Bacille de la souche inoculée; les deux pôles sont plus

chromophiles dans les formes courtes; il y a souvent, de plus, une bande transversale plus chromophile dans les formes longues. Il pousse bien à la température du laboratoire. En bouillon ordinaire, il donne un louche léger homogène, avec formation en surface autour du verre d'un anneau comme un fil blanchâtre, puis d'un voile semblable à une mince croûte fragile qui se brise en petits fragments et s'émulsionne assez bien. Il y a des restes de voile au fond des tubes après quelques jours. Les cultures en eau peptonée sont semblables à celles en bouillon. Sur gélose, le microbe forme de petites colonies arrondies, légèrement bombées, égales, jaune pâle, de près d'un millimètre de diamètre. Il ne liquéfie pas la gélatine, ne coagule pas le lait, ne digère pas le sérum coagulé, ne donne pas de fluorescence en gélose au rouge neutre, ni de noircissement en gélose au sous-acétate de plomb. Il ne pousse à peu près pas sur pomme de terre. Il bleuit le petit-lait tournesolé et rougit la gélose glucosée tournesolée, mais non la gélose additionnée de lévulose, de saccharose, de lactose, de mannite et de galactose. Il est très aérobic et ne pousse strictement que sur la surface de la gélose Veillon. Cependant, ce germe, repiqué quatre mois sur gélose ordinaire, fut inoculé en hiver à quatre *Geranium* sans provoquer de tumeurs. Mais les quatre plantes furent assez rapidement flétries.

B. INFECTION *in vitro*. — La possibilité de produire une infection aussi aiguë chez *Sipunculus nudus* fait supposer que le sang de ce Géphyrien est un bon milieu de culture pour le *Bact. tumefaciens*. Aussi ai-je voulu vérifier cette hypothèse, en ensemençant cette Bactérie dans les principaux éléments du sang de Siponcle, conservés stérilement *in vitro*. La saignée aseptique du Siponcle peut être pratiquée assez facilement avec une pipette à boule, après avoir séché, flambé à l'alcool et cautérisé l'animal quand il est rétracté, de préférence au niveau du cul-de-sac de la trompe. La centrifugation permet ensuite de séparer, entre autres, la couche profonde d'érythrocytes, le disque de leucocytes agglutinés et le plasma qui est incoagulable.

Plasma. — L'ensemencement en plasma donne en vingt-quatre heures à la température du laboratoire une culture de

Bact. tumefaciens sous forme de très petits flocons blanchâtres, irréguliers, suspendus dans le liquide, sans dépôt ni voile. Dans la suite, le milieu devient seulement louche et épais. Les examens microscopiques montrent qu'il s'agit bien d'une culture pure de *Bact. tumefaciens*, mais ce germe reste grêle.

Erythrocytes. — L'ensemencement dans un culot d'érythrocytes conservés en survie, en suspension dans un peu de plasma, permet au *Bact. tumefaciens* de cultiver et d'infecter ces cellules. On peut observer alors des érythrocytes dont le noyau seul est initialement infecté (fig. 15, A) et dont le cytoplasme est vacuolaire et chargé d'inclusions. Toutefois, la virulence n'étant pas exaltée par passage *in vivo*, l'hémolyse est faible. De plus, le pigment respiratoire, l'hémérythrine, ne disparaît pas plus vite que dans un tube témoin non ensemencé.

Leucocytes. — Enfin, si on ensemence avec le *Bact. tumefaciens* des leucocytes agglutinés mis en survie dans une goutte pendante de plasma homologue (1), on observe dès le lendemain, à la température du laboratoire, la prolifération du microbe et l'émigration des leucocytes. Cette sortie des leucocytes, très intéressante à d'autres points de vue, est nettement plus importante que celle des témoins non infectés. Ces phénomènes ne font du reste que s'accroître. Le quatrième jour, la coloration au Giemsa montre des plages importantes de *Bact. tumefaciens* et une couronne d'émigration formée de leucocytes à fines granulations éosinophiles, souvent groupés en plasmodes.

4° *Phascolosoma vulgare* de Blainv.

Les mêmes considérations m'ont incité à poursuivre chez un autre Géphyrien, le Phascolosome, une étude parallèle à celle faite sur le Siponcle.

(1) Cette expérience fut faite au cours de nombreuses tentatives de culture *in vitro* des leucocytes de *Sipunculus nudus*. Le plasma de Siponcle est un bon milieu et permet une survie d'au moins douze jours des divers leucocytes. Mais ce plasma est incoagulable. Tout le problème technique se ramène donc à trouver un milieu à base de plasma de Siponcle, rendu solide pour permettre l'émigration normale des leucocytes, puis les repiquages. L'addition de plasmas hétérologues coagulables donna des ébauches de cultures. Par contre, j'ai pu obtenir deux cultures dans un milieu composé de parties égales de plasma de Siponcle et de gélose-gélatine à 2 p. 100 dans de l'eau de mer. Mais je n'ai pas réussi à refaire ces expériences.

8 Phascolosomes reçoivent dans la cavité générale 0 c. c. 25 d'émulsion d'une culture sur gélose de *Bact. tumefaciens*. Ils font une infection aiguë qui se manifeste dès le lendemain par les signes habituels des infections chez ces animaux. Ils sont inertes, pâles, ne s'enfoncent plus dans le sable; leur corps est déformé, soit que l'on observe des boursofflures séparées par des anneaux resserrés, soit que les deux tiers antérieurs soient dilatés tandis que le reste devient presque filiforme. A la fin de l'infection apparaissent des taches et marbrures noirâtres sur les téguments, parfois des bulles gazeuses. La flore associée est en effet abondante, lors de l'agonie, et la putréfaction est très rapide. D'autre part, le sang peut être complètement décoloré. Le deuxième jour de l'infection, le sang de 2 Phascolosomes est inoculé à d'autres Phascolosomes et ainsi de suite. J'ai fait de la sorte six passages, utilisant 16 animaux neufs. La virulence du *Bact. tumefaciens* semble exaltée progressivement. Jusqu'au troisième passage, ces Géphyriens meurent en moyenne après deux jours d'infection, mais ils meurent le lendemain de l'inoculation aux quatrième et cinquième passages, enfin, en quinze heures environ, au sixième passage.

L'étude des frottis du sang de ces divers Phascolosomes m'a permis de retrouver des phénomènes très analogues à ceux que j'ai décrits chez le Siponcle, mais moins nettement dissociables. Comme l'indique déjà l'évolution de l'infection expérimentale, le Phascolosome est très sensible à l'inoculation de *Bact. tumefaciens*. Ce microorganisme se développe rapidement et d'emblée dans le plasma, infectant parallèlement les érythrocytes. L'infection de ces cellules suit du reste le même processus que chez le Siponcle, mais aboutit très rapidement à l'érythrolyse. La figure 16 représente par exemple un gros érythrocyte de Phascolosome dont le noyau, initialement infecté, est dégénéré. Mais le cytoplasme est parasité par une grande quantité de granules issus du *Bact. tumefaciens* et groupés surtout autour du noyau. On observe des formes bacillaires provenant du plasma, qui sont collées contre la membrane cellulaire. En somme, la multiplication du microbe à l'état libre dans le plasma est concomitante de l'infection cellulaire, au cours de laquelle se manifeste surtout la transformation du germe en grains. Les passages *in vivo* ne font que contribuer à

accélérer l'érythrolyse et à favoriser la multiplication des Bacilles dans le plasma. La succession des phénomènes est donc moins apparente que chez le Siponcle,

J'ai vérifié, ici aussi, que le sang de Phascolosome est un bon milieu de culture pour le *Bact. tumefaciens*. Du sang total, stérile, dont les éléments restent quelques jours en survie *in vitro*, estensemencé. Le microbe y cultive rapidement à la température du laboratoire et on le trouve en abondance dès le lendemain. Après quatre jours, le sang étant encore rosé, la culture est extrêmement riche.

Le Siponcle et le Phascolosome sont donc sensibles à une

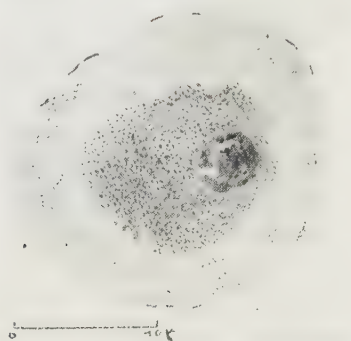


Fig. 16. — Gros érythrocyte de *Phascolosoma vulgare* infecté par le *Bact. tumefaciens*. Noyau dégénéré, amas considérable de granules bactériens près du noyau. Formes bacillaires appliquées contre la membrane cytoplasmique.

Color. Bleu de méthylène.

infection générale à *Bact. tumefaciens*. Les passages *in vivo* accroissent la virulence de ce microbe, qui détermine chez eux finalement une septicémie très aiguë. Le *Bact. tumefaciens*, surtout chez le Siponcle où on peut bien dissocier les stades de l'infection, envahit le noyau des érythrocytes qui dégénère, puis le cytoplasme, détruisant en fin de compte toute la cellule. Il se transforme généralement en grains, spécialement lorsqu'il infecte les cellules, ce qui paraît correspondre à une adaptation particulière, cytotope. Mais il forme une race de Bacilles vigoureux et libres dans le plasma, correlative au développement des propriétés septicémiques lors des passages *in vivo*.

V. — DISCUSSION.

Cette série de recherches montre que les invertébrés étudiés réagissent très peu à l'inoculation de substances irritantes ou favorisant la prolifération cellulaire. Mais ils sont, par contre, beaucoup plus sensibles à une infection à *Bact. tumefaciens* qui déclenche chez eux des réactions cellulaires importantes.

Le processus obtenu, par exemple, dans la tunique d'*Ascidia mentula* est assez remarquable; mais nous examinerons surtout celui qui a été produit chez *Nereis diversicolor*. Le *Bact. tumefaciens* peut déterminer chez cet annélide une réaction tumorale considérable, qui diffère complètement des néoformations que j'ai longuement étudiées antérieurement. L'inoculation du microbe aux *Nereis diversicolor* normales provoque seulement, en même temps qu'une infection générale, de petits granulomes infectieux formés de cellules lymphoïdes. Mais pour obtenir des tumeurs il semble que la présence d'un tissu déjà préparé par une irritation antérieure soit nécessaire, en l'espèce, un granulome dû à la dégénérescence des oocytes. Dans ce cas, le tissu mésenchymateux réticulé acquiert un certain développement, mais reste normal. Il semble bien que cette légère hyperplasie soit nécessaire à sa transformation ultérieure; nous avons vu, en effet, que les cas positifs n'ont été obtenus qu'en inoculant le *Bact. tumefaciens* au voisinage des granulomes à oocytes ayant un degré suffisant de développement. Toutes les inoculations faites au voisinage de granulomes peu développés n'ont déterminé que des réactions insignifiantes. Dans ces conditions seulement, le *Bact. tumefaciens* (et non pas, par exemple, les bactéries d'infection secondaire) est capable de communiquer au tissu réticulé des propriétés envahissantes nouvelles, non décrites jusqu'ici chez les invertébrés.

Ce tissu entre subitement en prolifération, il envahit et détruit les autres tissus voisins qu'il remplace. Ses cellules ont fréquemment des noyaux géants, elles se multiplient par mitose, souvent atypiques; elles peuvent enfin former des îlots tourbillonnaires à cellules fusiformes. Toutefois, je dirai seulement de ces grosses tumeurs qui évoluent si vite et qui ont de

propriétés destructives et envahissantes si prononcées, qu'elles ont l'aspect sarcomateux.

On ne peut pas, en effet, affirmer qu'elles sont réellement sarcomateuses. Les tissus dont il s'agit ici sont d'abord très différents, dans leur histo-physiologie, de ceux des animaux plus évolués. D'autre part, l'agent causal est celui des tumeurs des végétaux. Or, certains auteurs considèrent actuellement celles-ci comme des néoformations infectieuses, différentes des cancers proprement dits (1). Il se peut, du reste, que les tissus végétaux n'aient pas la possibilité d'acquérir une véritable malignité. Pour Engel (1930) ceux des invertébrés ne deviendraient pas cancéreux parce que leurs cellules gardent un caractère embryonnaire. Toutefois, dans le cas des tumeurs de *Nereis diversicolor*, il semble que la réponse des tissus à l'infection par le *Bact. tumefaciens* soit voisine de la malignité.

Chez *Nereis diversicolor*, le *Bact. tumefaciens* détermine, comme dans le cas d'Amormimo, une infection générale concomitante de la prolifération cellulaire, ce qui, du reste, complique l'expérience. De même Gheorghiu (1929-1930), dans un ordre de faits voisins, étudie une tumeur de la grenouille, à structure de sarcome fusocellulaire par endroits ou de sarcome polymorphe. Or, cette tumeur, qui est liée à la présence de Filaires et de Coccobacilles entre les cellules, peut être inoculée en série, mais la généralisation de l'infection microbienne tue souvent les grenouilles.

D'autre part, j'ai observé que le *Bact. tumefaciens* subissait dans les tissus tumoraux une évolution en granules. Cette transformation qui n'est pas due, dans ces cas, à la phagocy-

(1) C'est ainsi que Robinson et Walkden (1923) pensent que les analogies entre les cancers animaux et végétaux sont moins étroites que E. Smith ne l'admit. Les tumeurs secondaires ne sont que le résultat de la prolifération des cellules stimulées par les bactéries qui progressent dans les espaces intercellulaires et les vaisseaux. Il n'y a pas infiltration du tissu tumoral à de grandes distances. Lévine (1925) interprète de même les tumeurs secondaires, non comme des métastases, mais comme le produit de l'élongation des tissus inoculés. Il n'assimile pas les cellules des tumeurs végétales à celles des cancers. Les cellules des crown-gall n'ont pas de vraies divisions atypiques, elles deviennent séniles et meurent indépendamment de l'hôte. Stapp (1927) adopte aussi la même opinion en ce qui concerne les tumeurs secondaires. Pour Kauffmann (1928), les tumeurs des plantes ne sont que des granulomes infectieux. Pour Hamdi (1930) ce sont des malformations à la suite d'irritations continues, dont la propagation ne se fait que par migration bactérienne, comme le pense également Nabelek (1930).

tose, est un phénomène général; elle paraît corrélative à l'aptitude que peut avoir ce microorganisme de parasiter les cellules elles-mêmes. L'étude de l'infection du liquide cavitairé du Siponcle et du Phascolosome nous a montré que le *Bact. tumefaciens* se transforme généralement en granulations dans les cellules qu'il infecte, mais qu'il se multiplie surtout sous forme de Bacilles dans le plasma. Il subit la même transformation dans la tunique d'*Ascidia mentula*, mais reste sous forme d'amas de Bacilles quand il est seulement phagocyté par les cellules vacuolaires géantes. Au début de l'évolution des tumeurs de *Nereis*, le *Bact. tumefaciens* existe dans des groupes de cellules périphériques sous forme de Bacilles; mais dans les cellules tumorales plus évoluées on ne trouve que des granulations, parfois dans le noyau, qui semble provenir des formes bacillaires. Il se peut que l'évolution en granules du *Bact. tumefaciens* corresponde à une adaptation cytotrope, qui détermine elle-même, au moins en partie, la prolifération désordonnée que j'ai décrite.

On sait que dans les tumeurs végétales le *Bact. tumefaciens* n'est décelable que dans les cellules périphériques. « Chez les tumeurs de tomates produites par le *Bact. tumefaciens*, écrit Magrou (1927), l'examen microscopique et la culture montrent que ce microorganisme se développe abondamment dans les tissus superficiels de la galle, formés de cellules adultes ou mortes, alors qu'il fait défaut, tout au moins sous sa forme visible et cultivable, dans les îlots néoplasiques en voie d'accroissement. » Il semble que les formes granulaires ou peut-être invisibles du *Bact. tumefaciens*, qui paraissent avoir une affinité cytotrope spéciale, jouent un rôle dans la multiplication des cellules tumorales, à côté de l'action éventuelle des produits du métabolisme bactérien (1). Magrou et M^{me} Magrou (1926) ont montré que le *Bact. tumefaciens* exerçait une

(1) Les résultats obtenus ici font penser que dans les tumeurs végétales les formes granulaires ou même invisibles par les techniques usuelles jouent peut-être un rôle. Quelques auteurs ont du reste essayé de reproduire le crown-gall avec des filtrats de tumeurs ou de cultures de *Bacterium tumefaciens*. D'Hérelle et Peyre (1927), par exemple, partant d'une hypothèse particulière sur les rapports des bactéries et de l'agent bactériophagique, filtrent sur bougie Chamberland L3 des tumeurs de la betterave et les reproduisent par inoculation du filtrat. De même, en partant encore du filtrat (1930) ils auraient pu obtenir *in vitro* le retour du *Bacterium tumefaciens* à la forme bactérienne. Mais d'autres auteurs comme Thung (1929), Kauffmann (1929) ne peuvent pas obtenir par filtrat les tumeurs du *Geranium* ou du *Soleil*.

action à distance sur les cellules tumorales, comparable à celle décelée par Gurwitsch. Il serait peut-être intéressant d'évaluer l'intensité du pouvoir mitogénétique des formes granulaires du *Bact. tumefaciens* obtenues par exemple par filtration. Mais si ces formes granulaires paraissent intervenir dans la genèse des tumeurs infectieuses dont il vient d'être question, il serait imprudent d'assigner un rôle général semblable à des granulations analogues dans l'étiologie des cancers proprement dits, car des facteurs divers peuvent provoquer en fin de compte la viciation irréversible du métabolisme cellulaire qui aboutit à la malignité.

CONCLUSIONS.

1° L'inoculation de substances cancérigènes comme des extraits organiques additionnés d'arséniate de soude, d'indol, de coaltar, ne provoque dans la tunique d'*Ascidia mentula* et chez *Nereis diversicolor* que des réactions inflammatoires banales et de faible intensité. L'inoculation d'extrait homologue et d'arséniate de soude produit toutefois, chez *N. diversicolor*, une réaction lymphogénétique assez importante.

2° L'inoculation de *Bact. tumefaciens* détermine au contraire, dans la tunique d'*Ascidia mentula*, des phénomènes inflammatoires intenses, au cours desquels j'ai pu suivre la transformation des cellules vacuolaires en cellules pigmentaires excrétrices et en cellules géantes bourrées de *Bact. tumefaciens*.

3° Le microbe peut tuer *Nereis diversicolor* par septicémie; mais chez des *Nereis* portant déjà un granulome de taille suffisante dû à la dégénérescence des oocytes, il produit de grosses tumeurs du mésenchyme réticulé, à croissance rapide, envahissante et atypique.

4° Il tue de même par septicémie le Siponcle et le Phascolosome; il infecte d'abord le noyau des érythrocytes, puis le cytoplasme et détruit complètement ces cellules. Des passages *in vivo* accroissent sa virulence et corrélativement ses propriétés septiciques. Les érythrocytes, les leucocytes, le plasma de Siponcle, ainsi que le sang total de Phascolosome conservés stérilement *in vitro*, sont pour lui de bons milieux de culture.

5° Au cours de ces diverses infections, le *Bact. tumefaciens* a la possibilité de se transformer en granulations souvent à la

limite de la visibilité; ces granules bactériens paraissent avoir une affinité particulière pour les cellules et parfois même pour leur noyau. Alors que chez les Géphyriens elles provoquent l'érythrolyse, elles semblent être en rapport dans les tumeurs de *Nereis diversicolor* avec la multiplication cellulaire atypique.

(Institut Pasteur. Service de M. Lecomte du Noüy).

BIBLIOGRAPHIE

- AMORMINO (G.). Ricerche sull'azione del *Bacterium tumefaciens* negli animali. (Nota prelim.). *Boll. di Soc. Ital. di Biol. Sper.*, **2**, 1928, p. 822-827.
- AMORMINO (G.). Sarcoma a cellule fusate in un pesce iniettato con il *Bacterium tumefaciens*. *Arch. Sci. Med. Torino*, **52**, 1928, p. 481-495.
- ASKANAZY (H.). Ueber den Einfluss des Arsens auf verpflanztes embryonales Gewebe. *Verhandlung der Deuts. Photo. Gesell.*, **21**, 1926, S. 182.
- ASKANAZY (H.). Die Krebsbildung vom Standpunkt der Komplexen Reizwirkung betrachtet. *Wien. Klin. Woch.*, **11**, 1927, S. 609-613.
- AZEMA (M.). Sur la formation des vésicules rénales et le développement du rein chez *Ascidia mentula* (Müll.). *C. R. Acad. Sc.*, **183**, 1926, p. 1129-1131.
- BEGG (A. M.) and 'CRAMER (W.). On the alleged experimental production of malignant tumours in the fowl. *Lancet*, **217**, 1929, p. 697-698.
- BORCHI (B.) et LUZZATO (G.). Ricerche intorno al potere oncogeno del *Bact. tumefaciens* e del *B. Paola Meyer* nelle piante e negli animali. *Boll. Insti. sierot. milen.*, **8**, 1929, p. 243-255.
- CANTACUZÈNE (J.). Recherches sur les réactions d'immunité chez les invertébrés. 1^o Mémoire : Réactions d'immunité chez *Sipunculus nudus*. *Arch. Roumaines de Path. exper. et de Microb.*, **1**, 1928, p. 1-80.
- CARREL (A.). Le principe filtrant des sarcomes de la poule produit par l'arsenic. *C. R. Soc. Biol.*, **93**, 1925, p. 1083-1085.
- CARREL (A.). Un sarcome fusocellulaire produit par l'indol et transmissible par un agent filtrant. *C. R. Soc. Biol.*, **93**, 1925, p. 1278-1280.
- DEELMAN (H. T.). A propos du sarcome de Rous et des récentes expériences de Carrel. *Ann. de Méd.*, **24**, 1928, p. 360-370.
- ENGEL (C. S.). Warum erkranken wirbellose Tiere nicht an Krebs? *Zeitschr. f. Krebsforsch.*, **32**, 1930, S. 531-543.
- GHEORGHIU (I.). Contribution à l'étude du cancer de la Grenouille. *C. R. Soc. Biol.*, **103**, 1930, p. 280-281.
- HAMDI (H.). Ueber die Histogenese, Bau und Natur des sog. Pflanzenkrebses und dessen Metastasen. *Zeitschr. f. Krebsforsch.*, **30**, 1930, S. 547-552.
- HERELLE (F. d') et PEYRE (E.). Contribution à l'étude des tumeurs expérimentales. *C. R. Acad. Sc.*, **185**, 1927, p. 227-230.
- HERELLE (F. d') et PEYRE (E.). Etudes sur la flore microbienne de certaines tumeurs expérimentales. 3^e Conférence de la *Leuwenhoek. Vereniging de Bussy Edit. Amsterdam*, 1930, p. 159.
- KAUFFMANN (F.). Zur tumefaciensfrage. *Zeitschr. f. Krebsforsch.*, **28**, 1928, S. 109-120.
- KAUFFMANN (F.). Zur Biologie der tumefaciensstämmen. *Zeitschr. f. Krebsforsch.*, **30**, 1929, S. 290-294.

- KOSTRITSKY (M^{lle}), TOUMANOFF (M^{me}) et MÉTALNIKOW (S.). *Bacterium tumefaciens* chez la chenille de *Galleria mellonella*. *C. R. Acad. Sc.*, **179**, 1924, p. 225-226.
- LABBÉ (A.). Réaction du tissu conjonctif au goudron chez un mollusque. *Doris tuberculata* Cuvier. *C. R. Soc. Biol.*, **103**, 1930, p. 20-22.
- LEVINE (M.). The so called strands and secondary tumors in the crown-gall disease. *Phytopatho.*, **15**, 1925, p. 431-435.
- LEVINE (M.). A comparative cytological study of the neoplasms of animals and plants. *Journ. of Cancer Research*, **9**, p. 41-49.
- MAGROU (J.). Recherches anatomiques et bactériologiques sur le cancer des plantes. *Ces Annales*, **41**, 1927, p. 785-801.
- MAGROU (J.). Actions biologiques à distance. *Bull. Inst. Pasteur*, **28**, 1930, p. 393-405 et 441-448.
- MAISIN (J.) et DUPOIS (P.). Embryones et cancers. *Revue belge des Sc. Méd.*, 1929, **1**, p. 409.
- MURPHY (J. B.) and LANDSTEINER (K.). Experimental Production and Transmission of tar Sarcomas in Chickens. *Journ. of Exp. Med.*, **61**, 1925, p. 807-816.
- NABELEK (V.). Das Krebsproblem der Pflanze. Eine phytopathologische Studie über die Einwirkung der Bakterien auf die Heilungsprozesse der Pflanze. *Prace Ucené společnosti Safarikovy V Bratislve Prague*, 1930, p. 36.
- ROBIN (W.) and WALDKEN (H.). A critical Study of Crown-gall. *Ann. of Bot.*, **37**, 1923, p. 299-324.
- SMITH (E. F.). An Introduction to Bacterial Diseases of Plants. *W. B. Saunders Company, Philadelphia and London*, 1920, p. 1-688.
- STAPP (C.). Der Bakterielle Pflanzenkrebs und seine Beziehungen zum tierischen und menschlichen Krebs. *Berl. Deutsch. Bot. Ges.*, **45**, 1927, S. 480-504.
- THOMAS (J. A.) [a], Etude d'un processus néoplasique chez *Nereis diversicolor* O. F. M. dû à la dégénérescence des oocytes et quelquefois des soies. *Arch. Anat. Micro.*, **24**, 1930, p. 251-333.
- THOMAS (J.-A.) [b], Sur la répartition aux environs de Roscoff d'une néoplasie de *Nereis diversicolor* O. F. M. Essai écologique. *Bull. Biol. de France et de Belgique*, **64**, 1930, p. 332-354.
- THOMAS (J.-A.). Réactions de deux invertébrés : *Ascidia mentula* Müll. et *Nereis diversicolor* O. F. M. à l'inoculation de substances à propriétés cancérogènes. *C. R. Soc. Biol.*, **108**, 1931, p. 667-669.
- THOMAS (J.-A.). Sur les réactions de la tunique d'*Ascidia mentula* Müll. à l'inoculation de *Bacterium tumefaciens* Sm. *C. R. Soc. Biol.*, **108**, 1931, p. 694-696.
- THOMAS (J.-A.). Sur l'infection expérimentale du Géphyrien *Sipunculus nudus* par le *Bact. tumefaciens* Sm. *C. R. Soc. Biol.*, **108**, 1931, p. 772-774.
- THOMAS (J.-A.). Production de tumeurs d'apparence sarcomateuse chez l'annélide *Nereis diversicolor* O. F. M., par inoculation de *Bact. tumefaciens* Sm. *C. R. Ac. Sc.*, **193**, 1931, p. 1045-1047.
- THUNG (T. H.). Experimenten met *Bacterium tumefaciens* Sm. et Towns. *Tijdsch. over plantenziekten*. 36^e année, 1929, p. 263-269.
- TURCHINI (J.) et HARENT (H.). Parenté entre les cellules vacuolaires et les vésicules rénales d'*Ascidia mentula*. *C. R. Soc. Biol.*, **95**, 1926, p. 1535-36.

Le Gérant : G. MASSON.